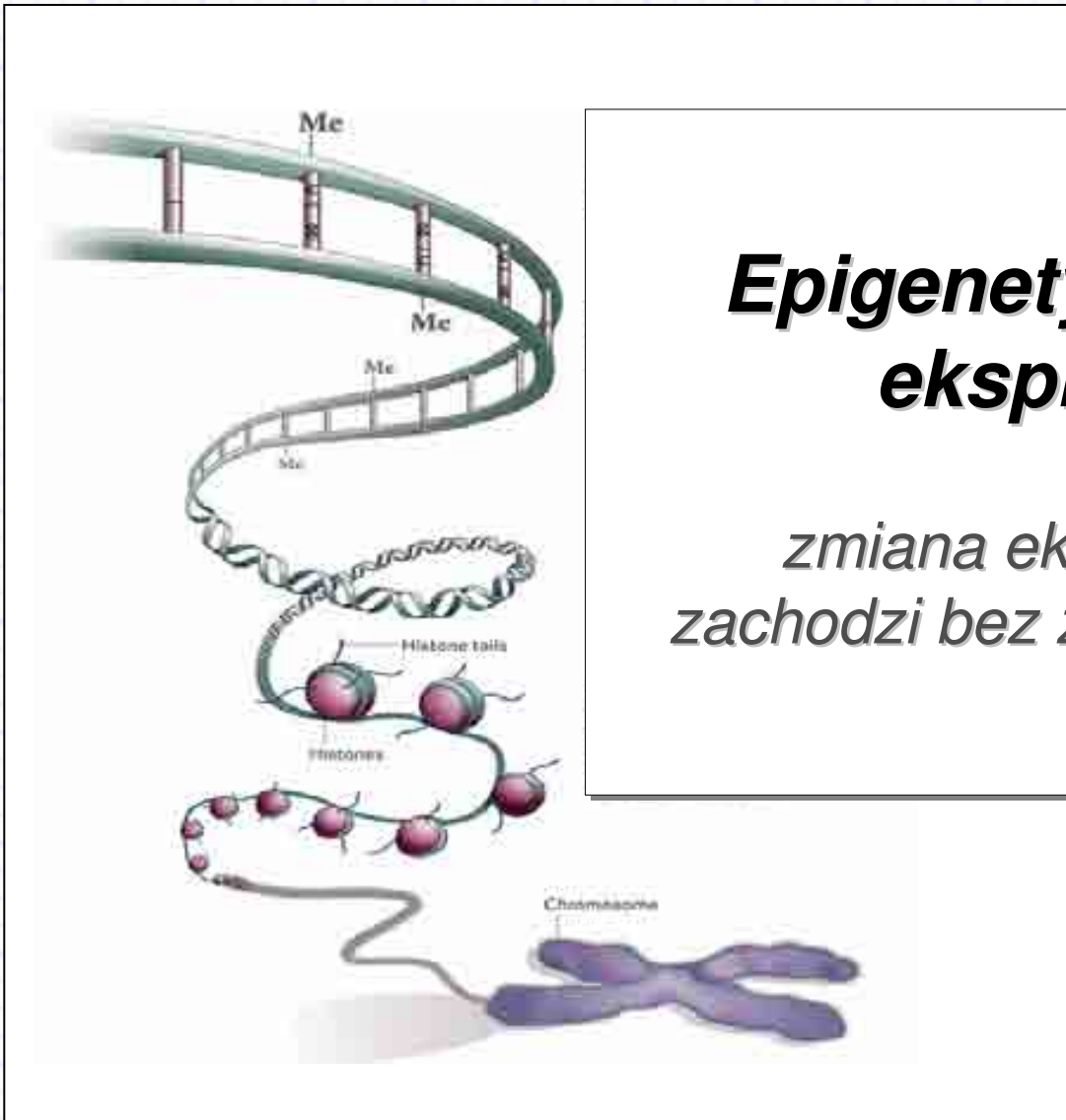


## ***Rola chromatyny w regulacji ekspresji genów***

**Monika Zakrzewska-Płaczek**  
*monika.z@ibb.waw.pl*

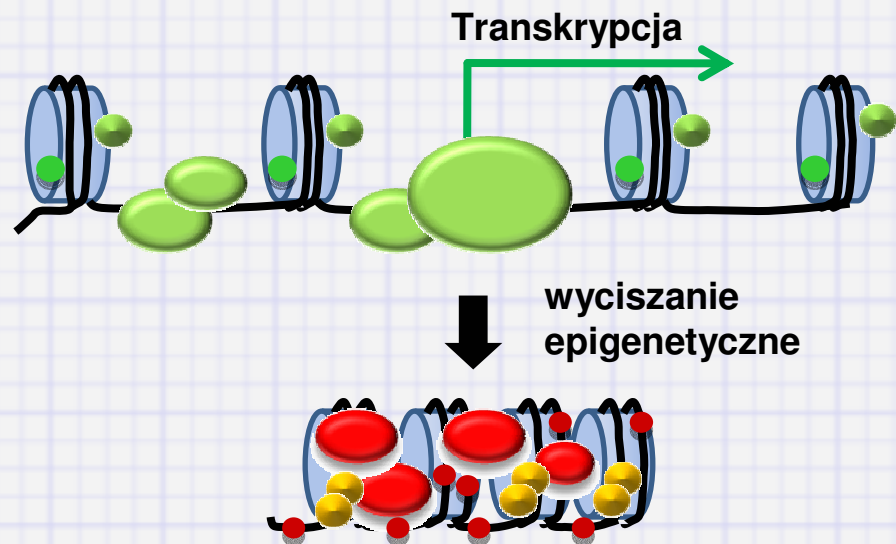


***Epigenetyczna regulacja ekspresji genów***

*zmiana ekspresji genu, która zachodzi bez zmiany sekwencji DNA*

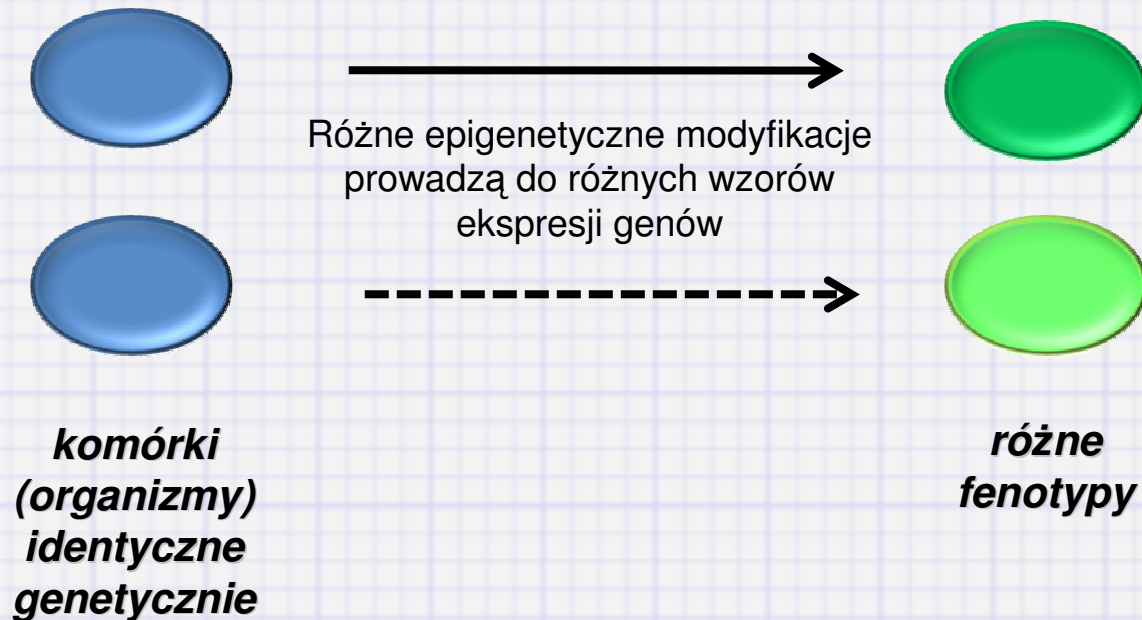
# Co oznacza “epigenetyka”?

- **Dosłownie, słowo „epigenetyka” oznacza „powyżej genetyki”**
- **Jest to informacja pozagenowa, nie dotycząca samej sekwencji, ale kowalencyjnych modyfikacji DNA i zmian struktury chromatyny**



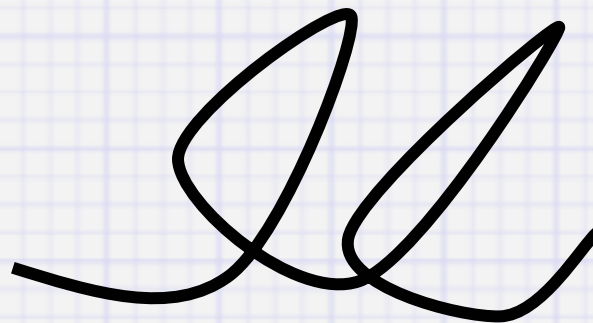
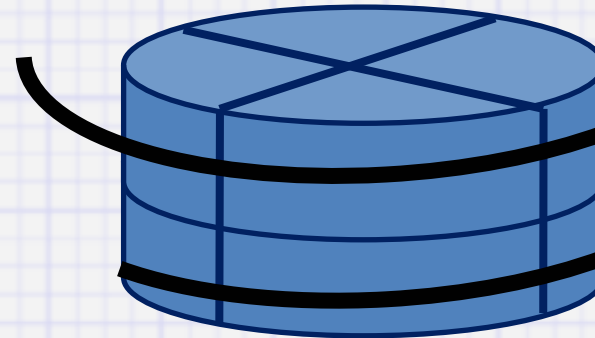
# Co oznacza “epigenetyka”?

**W praktyce**, epigenetyka opisuje zjawiska, dzięki którym w identycznych genetycznie komórkach lub organizmach dochodzi do różnego sposobu ekspresji genów czego efektem są różnice fenotypowe.



# Struktura chromatyny

~147 bp DNA jest „owinięty” wokół oktameru białek histonowych



~ 147 bp DNA

+



**8 histonów:**

**2x H2A**

**H2B**

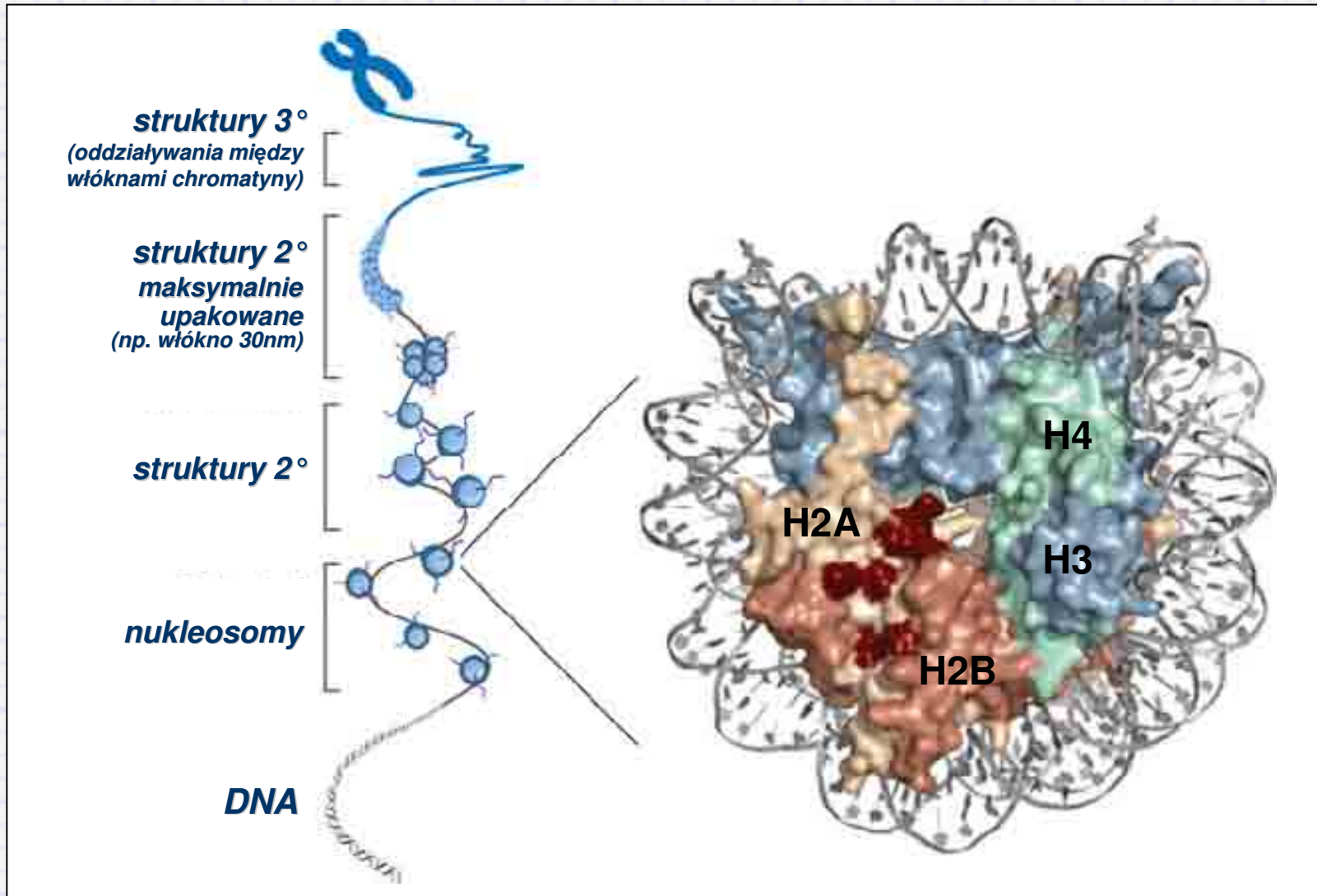
**H3**

**H4**

+ 50bp DNA łącznikowego

+ histon H1

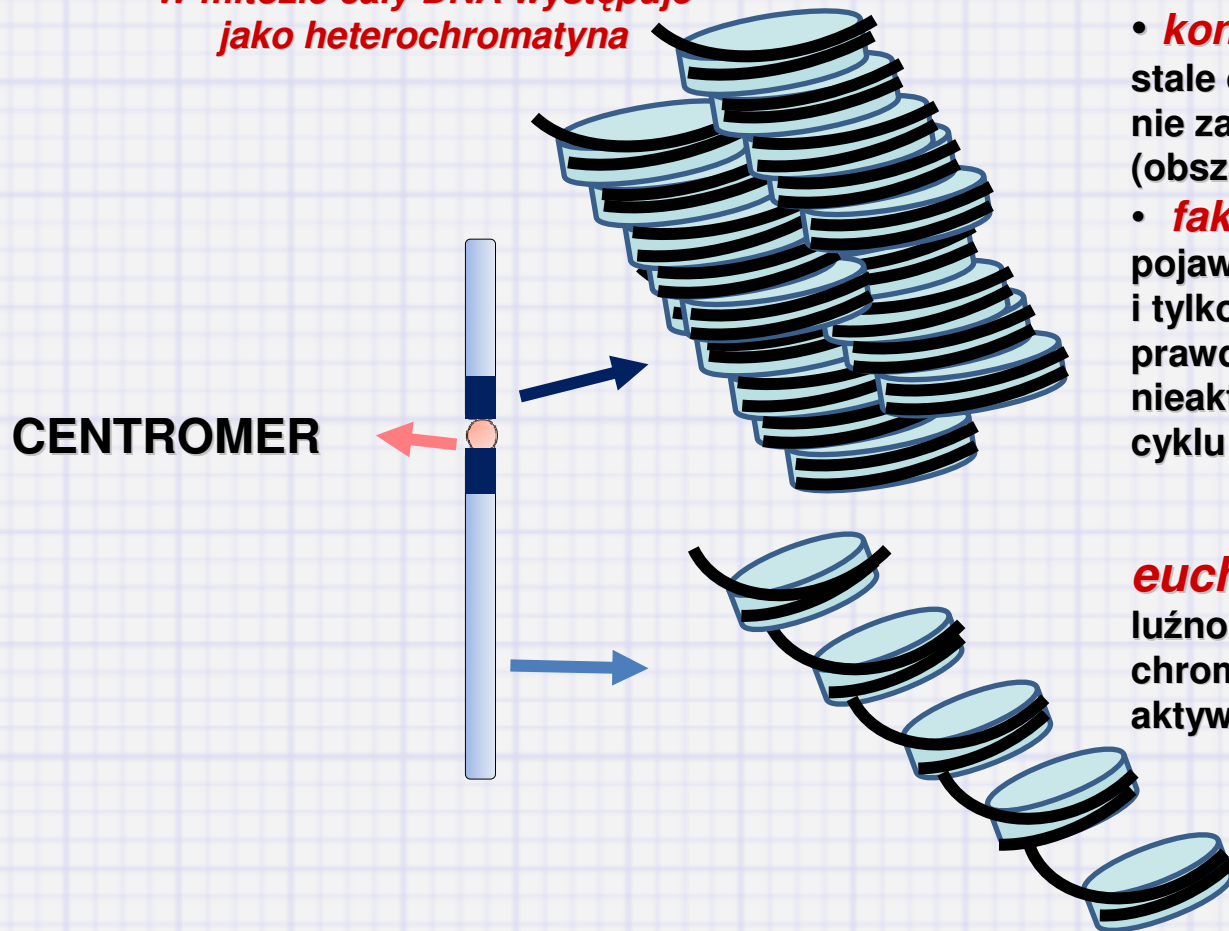
# Struktura chromatyny





# Struktura chromatyny:

W mitozie cały DNA występuje jako heterochromatyna



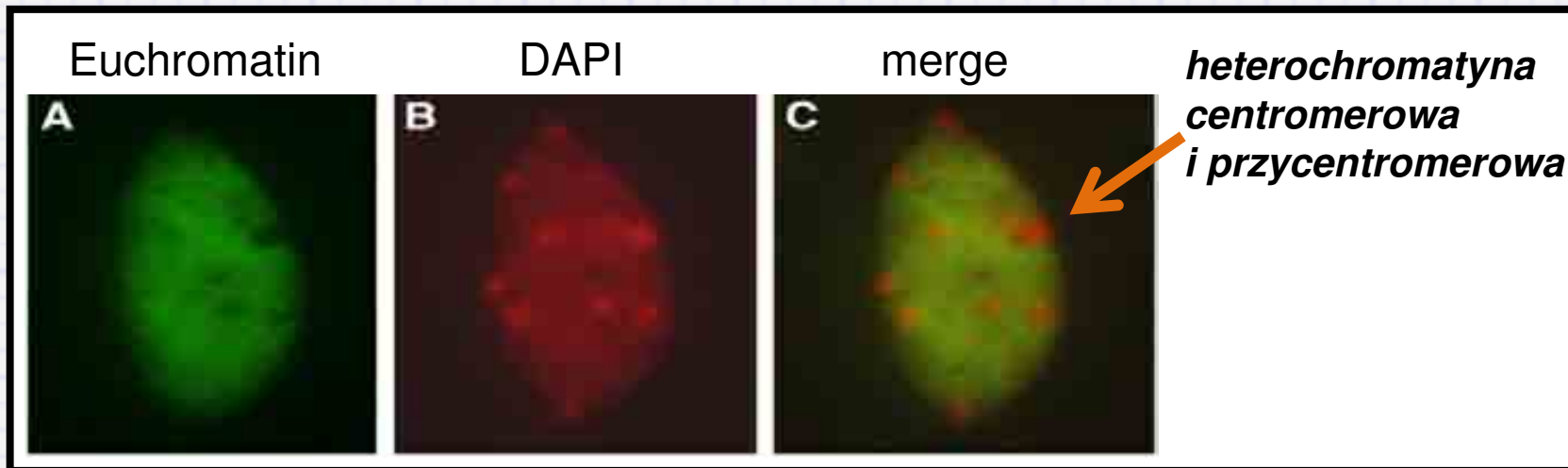
## **heterochromatyna**

- **konstrytutywna**  
stałe obecna w komórce,  
nie zawiera genów  
(obszary centromerów i telomerów)
- **fakultatywna**  
pojawia się w jądrze okresowo  
i tylko w niektórych komórkach,  
prawdopodobnie zawiera geny  
nieaktywne w czasie niektórych faz  
cyklu komórkowego

## **euchromatyna**

luźno upakowana forma  
chromatyny, zawierająca geny  
aktywne transkrypcyjnie

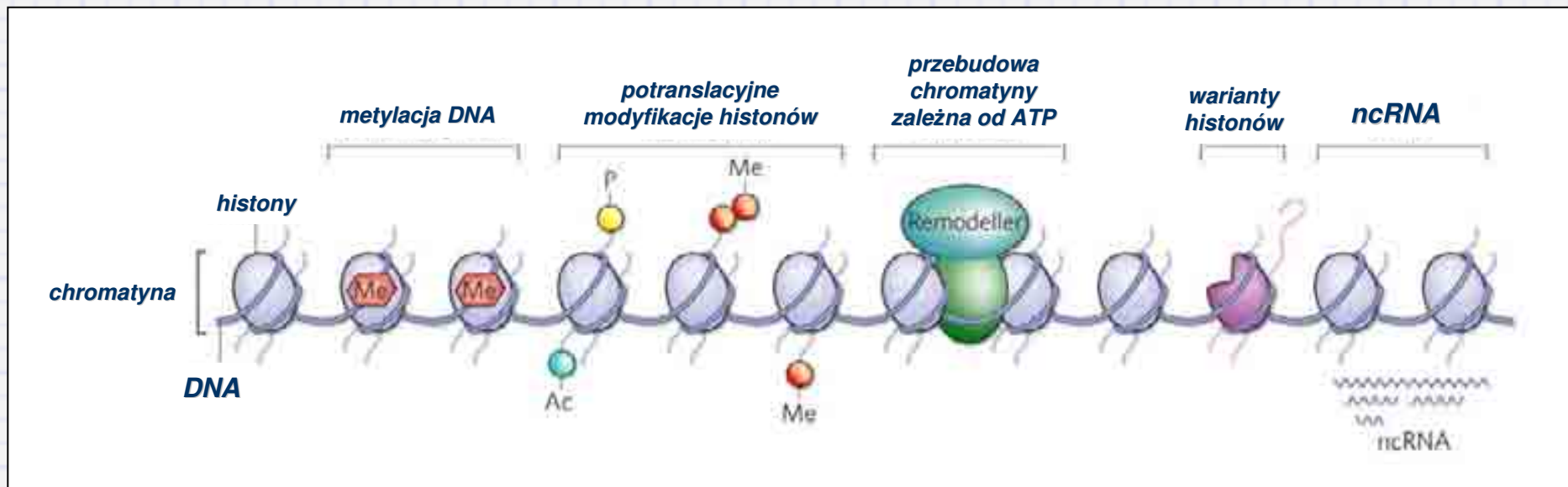
# Heterochromatyna i euchromatyna tworzą obszary o różnej gęstości w jądrze komórkowym



*Immunolokalizacja z przeciwciałem anty-H2A.Z w komórkach liści A. thaliana*

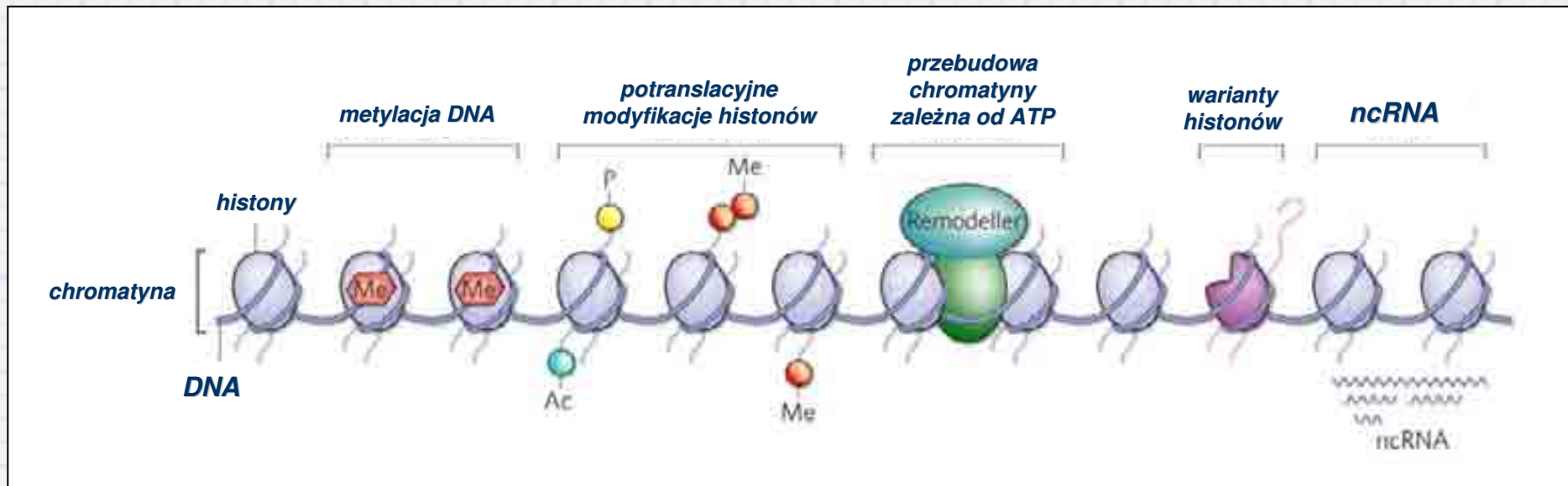


# Mechanizmy epigenetyczne kontroli ekspresji genów



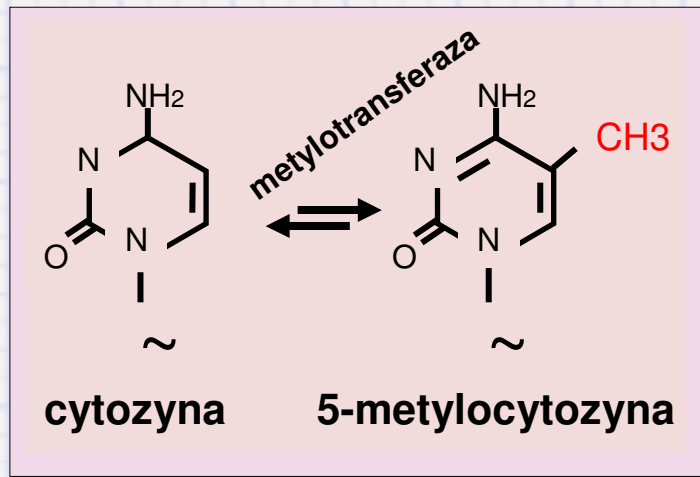
Dulac C. (2010) Nature

# Metylacja DNA



Dulac C. (2010) Nature

# Metylacja DNA



DNA może być kowalencyjnie modyfikowany w reakcji metylacji cytozyny: wyst. u ssaków i roślin, ale nie u niższych zwierząt czy drożdży

5-metylo-  
cytozyna



## Rola metylacji DNA:

imprinting, inaktywacja chromosomu X, rozwój embrionalny, represja sekwencji powtórzonych i transpozonów

# Metylotransferazy DNA u *Arabidopsis thaliana*

## **MET1 (METHYLTRANSFERASE1) – 5'-CG-3' i 5'-CNG-3'**

- *wyciszanie transpozonów, powtórzeń DNA, piętnowanie niektórych genów*

## **CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) – 5'-CHG-3'**

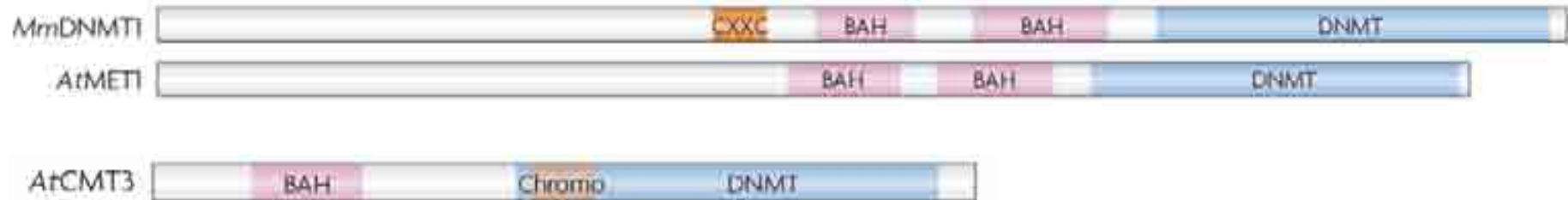
- *(H= A, C lub T)*
- *specyficzna dla roślin*
- *może być rekrutowana przez metylotransferazę histonową SUVH4 (KYP), a więc odpowiadać na modyfikację białek histonowych*

## **DRM1/ DRM2 (DOMAINS REARRANGED 1/2) – 5'-CHH-3'**

- *metylacja de novo – DRM2*
- *metylacja powtórzeń DNA wyciszanych przez siRNA*

# Metylotransferazy DNA (DNMT)

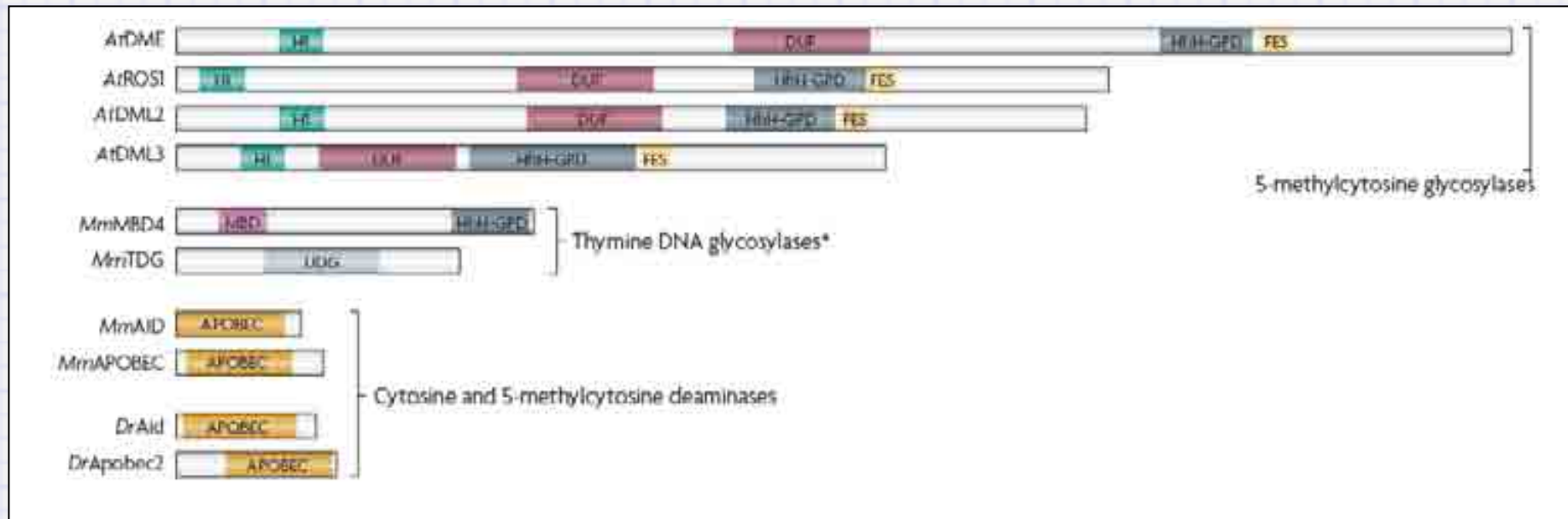
## *metylotransferaza DNA 1*



## *de novo:*

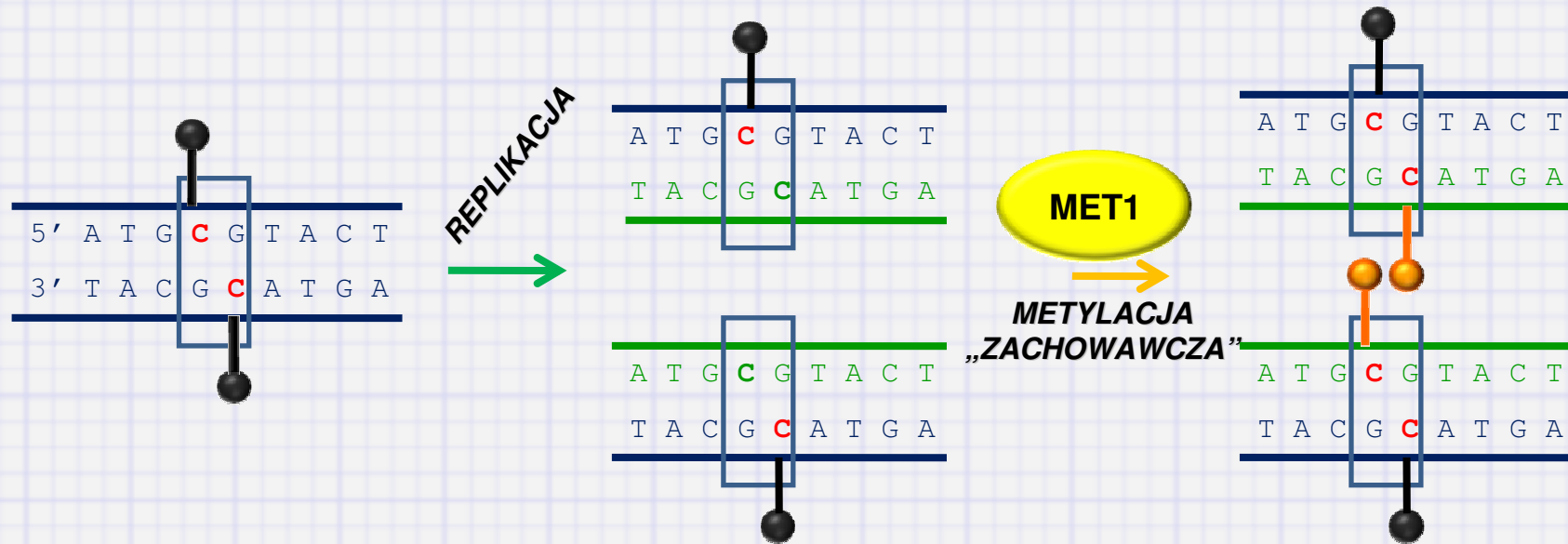


# Usuwanie grup metylowych - demetylacja

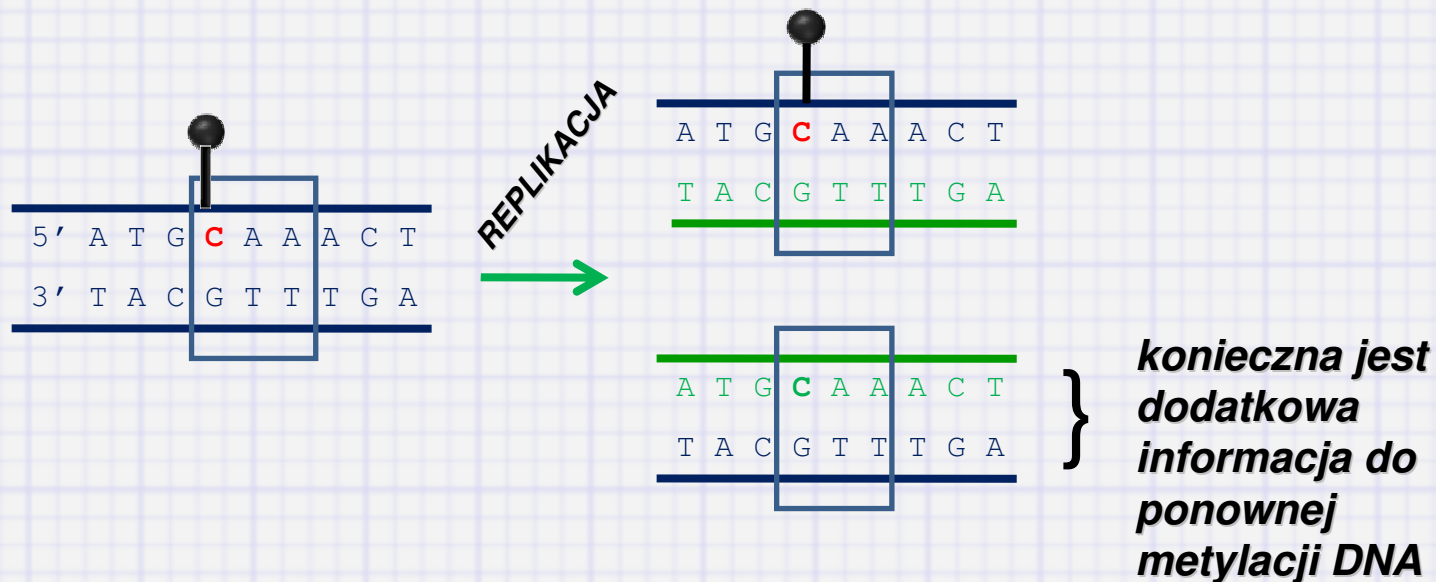




# Metylacja CG (symetryczna) może być przenoszona podczas replikacji DNA

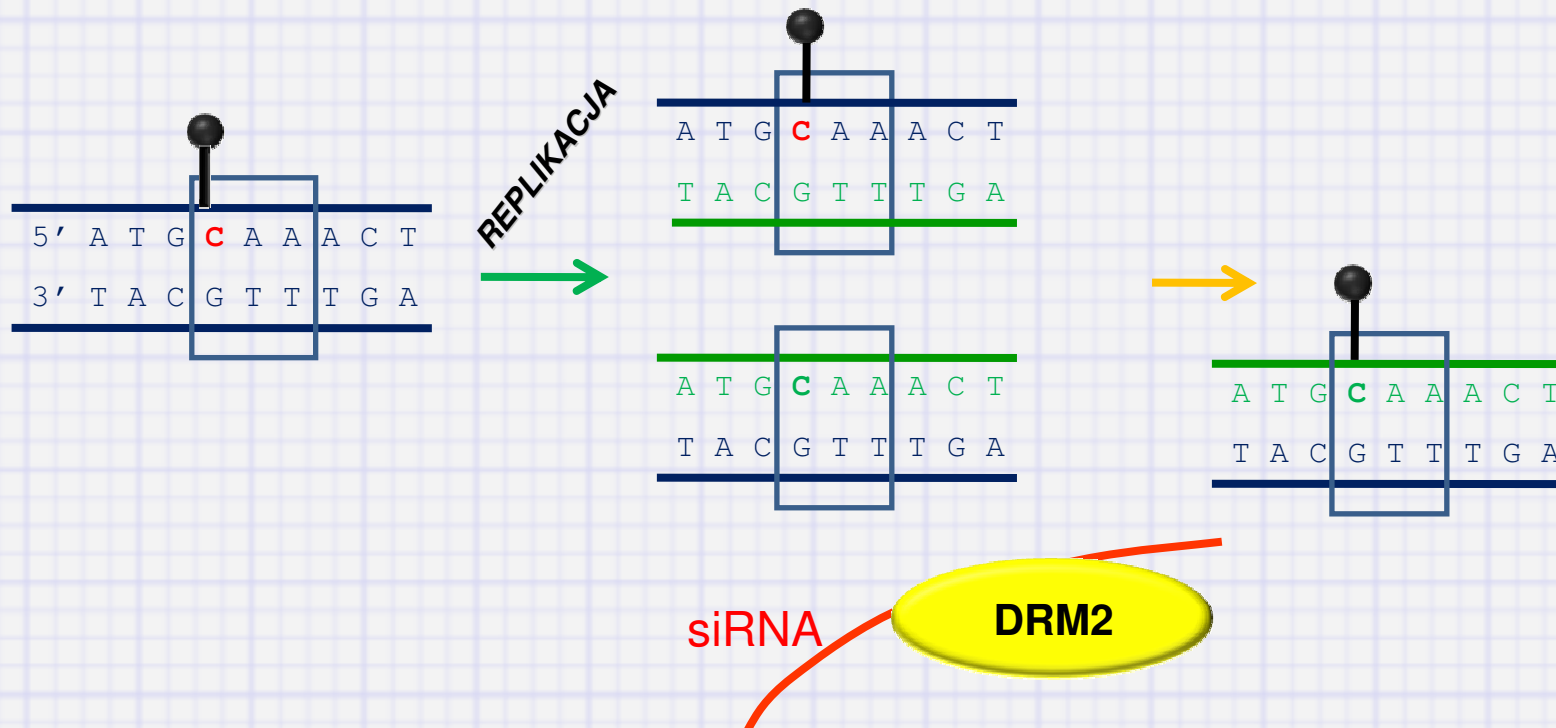


# Asymetryczne miejsca metylacji: CHH ( $H = A, C \text{ lub } T$ )



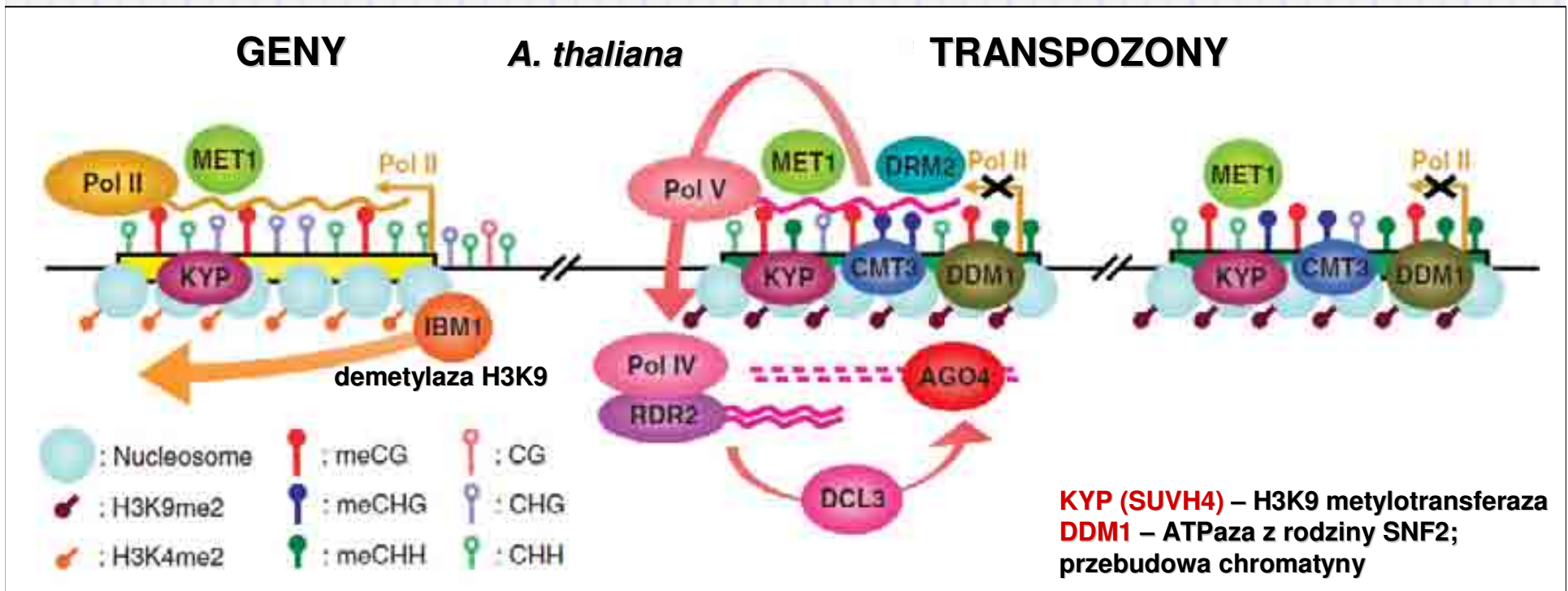
*Metylacje w miejscach asymetrycznych są utrzymywane (i inicjowane) dzięki informacji zawartej w odpowiednich modyfikacjach białek histonowych, na drodze mechanizmu **metylacji DNA zależnej od RNA** (RNA-directed DNA Methylation, **RdDM**)*

# Metylacje cytozyny w niektórych miejscach są utrzymywane przez siRNA → RdDM



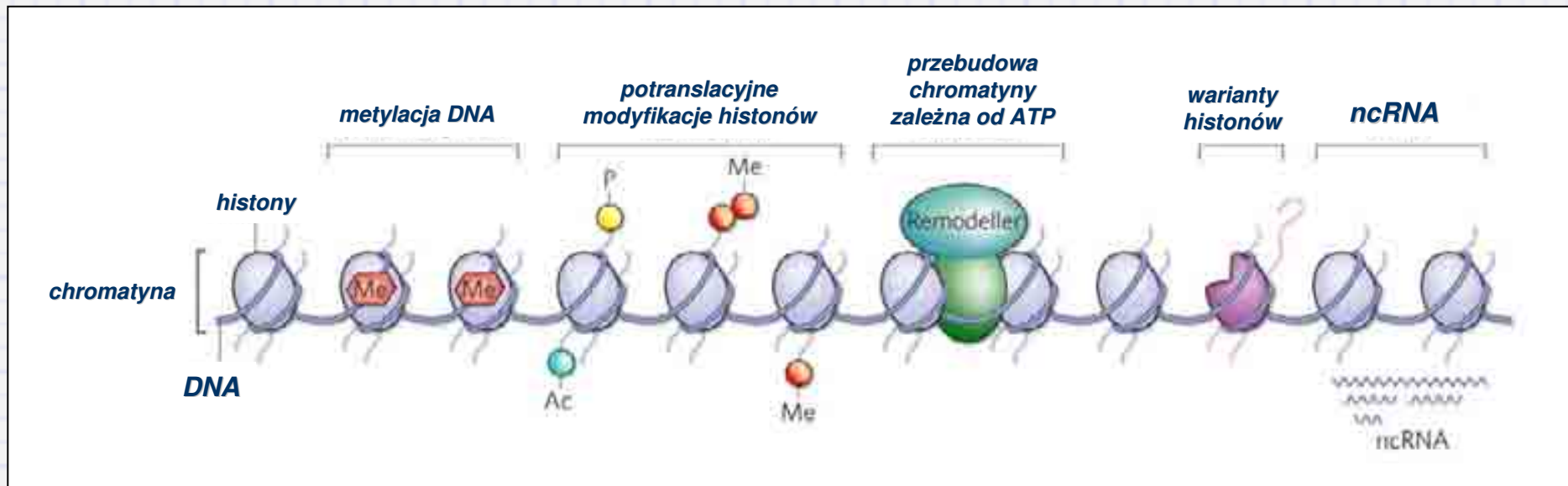
# Głównym celem metylacji cytozyn jest wyciszenie transpozonów i powtórzeń DNA

*Nie wszystkie transpozony są wyciszane na drodze mechanizmu RNAi*



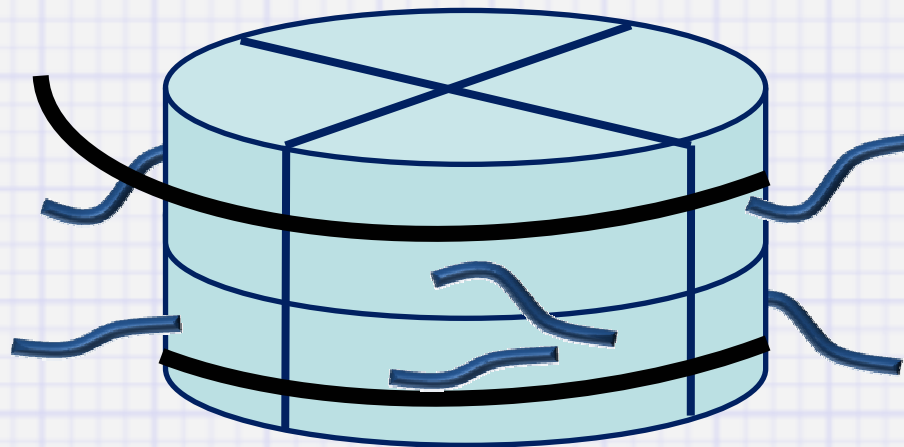
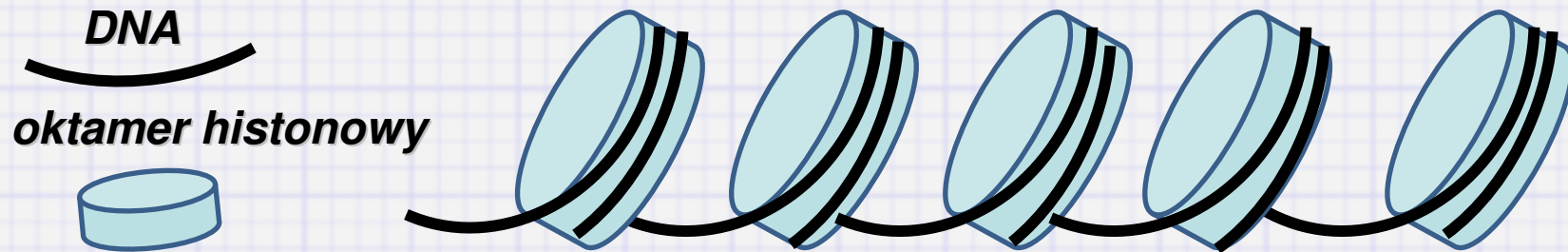
*Do zmetylowanego DNA przyłączają się białka z domeną MBD (methyl-CpG binding domain), do których z kolei wiąże się kompleks deacetylazy histonowej, co prowadzi do kondensacji chromatyny i represji ekspresji genów; mogą się również przyłączać metylotransferazy histonowe*

# Potranslacyjne modyfikacje białek histonowych



Dulac C. (2010) Nature

# Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny

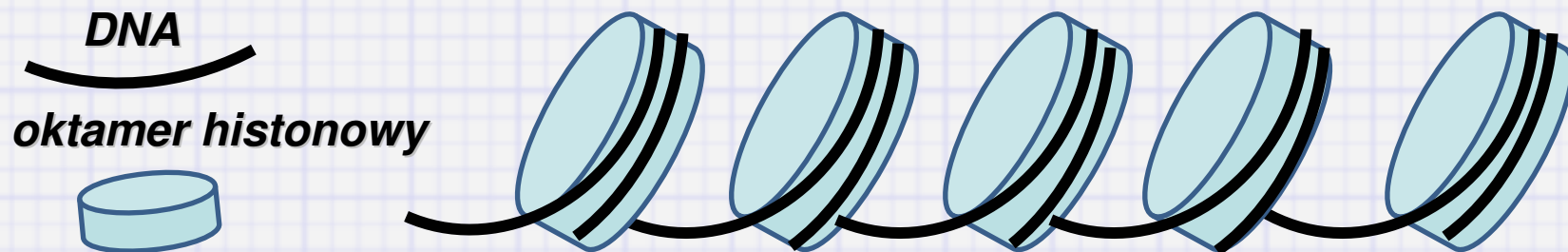


**NUKLEOSOM**

**Końce N białek histonowych (tzw. ogony histonowe) wystają poza nukleosom, są dostępne dla enzymów modyfikujących**



# Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny

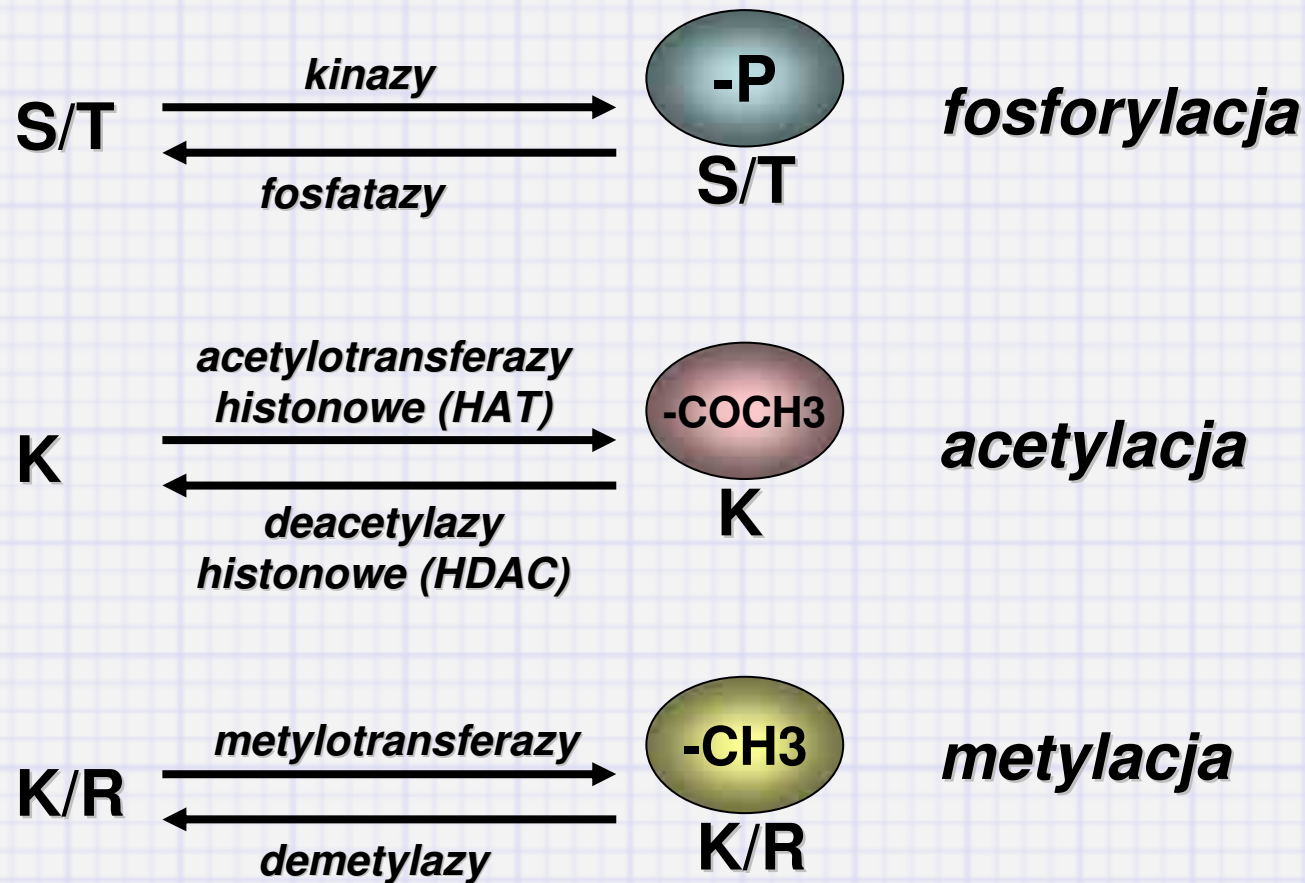


## Modyfikacje histonów: (kod histonowy)

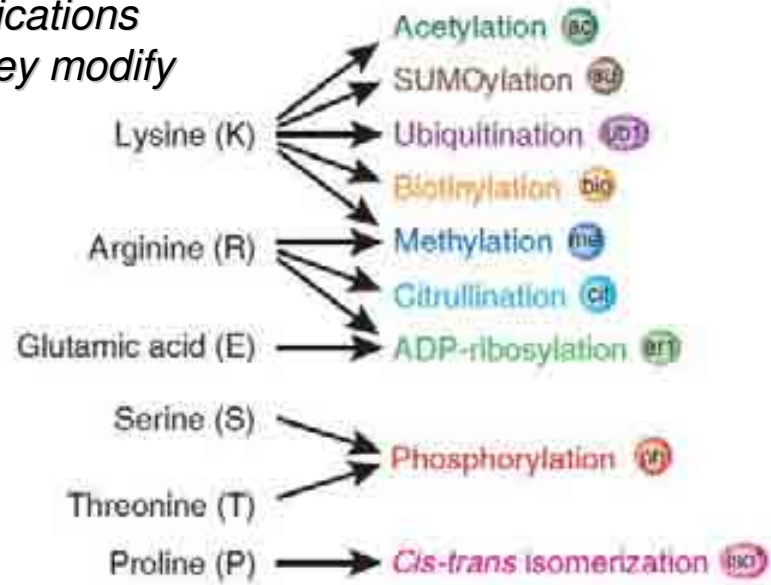
- **acetylacja (Ac)**
- **metylacja (Me)**
- **fosforylacja (P)**
- **ubikwitynacja (Ub)**
- **sumoilacja (Su)**

***W zależności od miejsca w/w modyfikacji mogą one przyczyniać się do aktywacji lub inaktywacji transkrypcji***

# Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny



Known post-translational modifications  
and the amino acid residues they modify

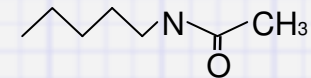


# Acetylacja lizyny białek histonowych

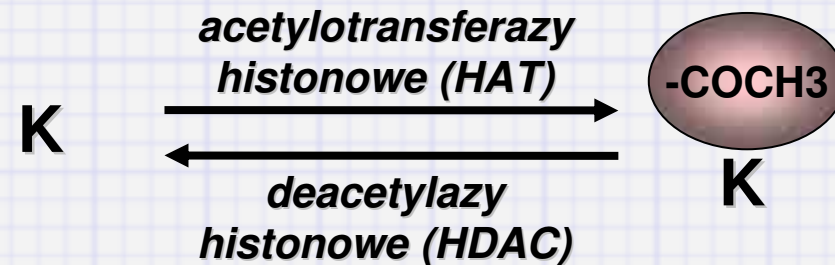
- *seria acetylo-lizyn (bardziej obojętne niż dodatnio naładowane lizyny) na ogonach histonów osłabia interakcje elektrostatyczne między histonami a DNA, co pozwala na rozluźnienie struktury chromatyny*
- *inne funkcje: regulacja naprawy DNA poprzez przebudowę chromatyny; acetylowane lizyny są wtedy miejscami przyłączenia dla białek przebudowujących chromatynę (poprzez bromodomenę)*
- *za acetylację odpowiedzialne są acetylotransferazy (HAT), a donorem grupy acetylowej jest acetylo-CoA*
- *acetylacja jest odwracalna; deacetylację przeprowadzają deacetylazy (HDAC)*



lizyna (K)



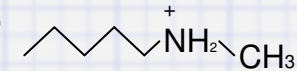
acetylowana lizyna (KAc)



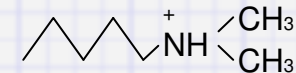
# Metylacja białek histonowych

- **metylacja lizyny powoduje zwiększenie hydrofobowego i kationowego charakteru tej reszty aminokwasowej; w zależności od enzymu lizyna może być mono, di lub trimetylowana.**
- **za metylację odpowiedzialne są metylotransferazy (HMT) zawierające domenę SET, a donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM) lub S-adenozylhomocysteina (AdoHcy); metylacja H3K79 katalizowana jest przez Dot1 spoza rodziny Set**
- **usunięcie grup metylowych: wymiana nukleosomów, modyfikacje chemiczne zmetylowanych reszt lub enzymatyczna demetylacja**

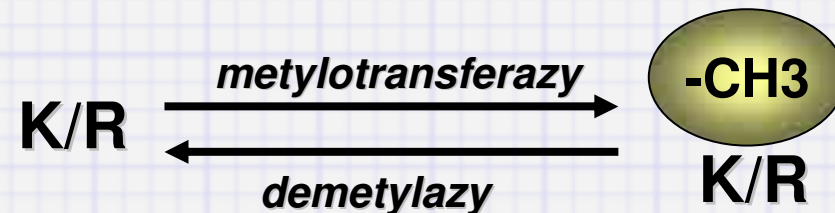
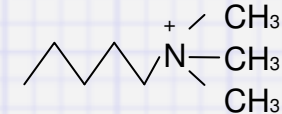
**metylowana lizyna**  
**Mono (Kme1)**



**Di (Kme2)**



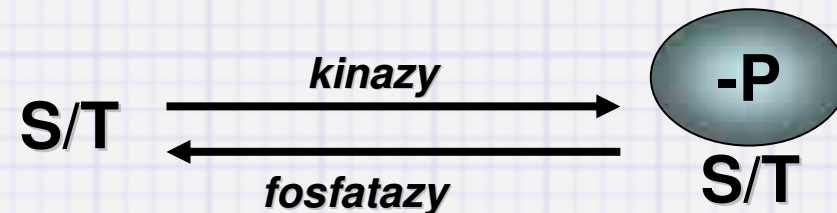
**Tri (Kme3)**





# Fosforylacja białek histonowych

- **Fosforylacje seryn H3S10 i H3S28 niezbędne są do kondensacji chromosomów i prawidłowej mitozy; także pozytywna rola w aktywacji transkrypcji: hamuje metylację H3K9 i promuje acetylację lizyn położonych w jej sąsiedztwie**
- **Zidentyfikowano ufosforylowane seryny na wszystkich histonach (fosforylacja wariantu H2A niezbędna jest w aktywacji naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego po uszkodzeniu DNA)**





## Przykład – modyfikacje H3

		Me					Me	P		Ac		Me	Ac		Ac		Me	Me	P									
<b>H3</b>	A	R	T	<b>K</b>	Q	T	A	R	<b>K</b>	<b>S</b>	T	G	G	<b>K</b>	A	P	<b>R</b>	<b>K</b>	Q	L	A	T	<b>K</b>	A	A	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>S</b>
				4					9	10				14			17	18				23			26	27	28	

*Koniec N histonu H3 jest często modyfikowany (w jednym lub kilku miejscach), co przyczynia się do aktywacji lub inhibicji transkrypcji.*

# Przykład – modyfikacje H3

**H3**

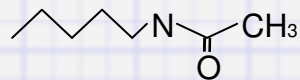
	Me		Me P		Ac	Me Ac		Ac	Me Me P
	A R T <b>K</b> Q T A R	<b>K</b> <b>S</b>	T G G	<b>K</b> A P	<b>R</b> <b>K</b> Q L A T	<b>K</b> A A	<b>R</b> <b>K</b> <b>S</b>		
	4	9 10		14	17 18	23	26 27 28		

*Koniec N histonu H3 jest często modyfikowany (w jednym lub kilku miejscach), co przyczynia się do aktywacji lub inhibicji transkrypcji.*

Lizyna może być acetylowana lub mono-, di-, lub tri-metylowana



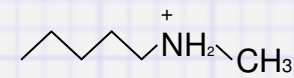
**lizyna (K)**



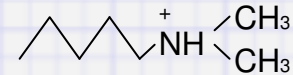
**acetylowana lizyna (KAc)**

metylowana lizyna

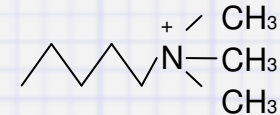
**Mono (Kme1)**



**Di (Kme2)**

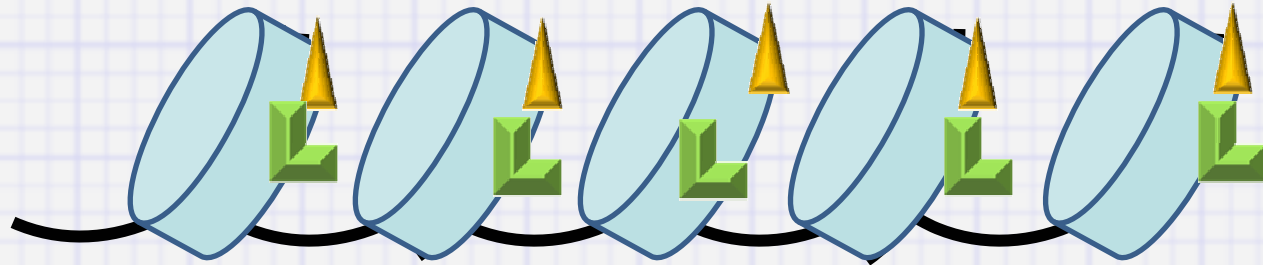


**Tri (Kme3)**

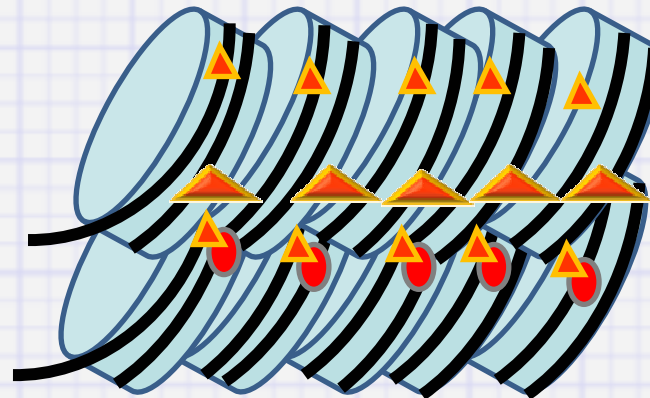


# Modyfikacje białek histonowych zmieniają strukturę chromatyny

<b>H3</b>	Me	P	Ac
	K4	S10	K14



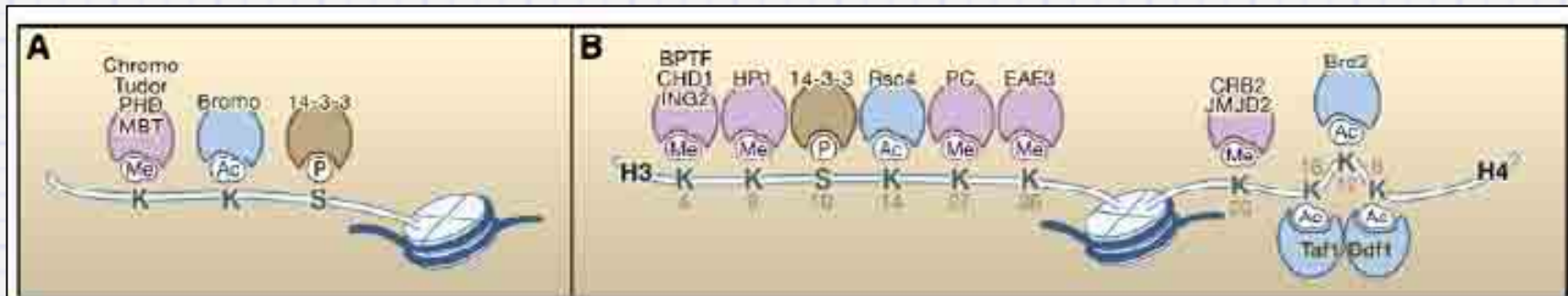
<b>H3</b>	Me	Me P
	K9	K27 S28



# Mechanizm działania modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych

**Działanie bezpośrednio: zmiany w oddziaływaniach histon-DNA i histon-histon**

**Działanie pośrednie: rekrutacja białek rozpoznających określone modyfikacje histonów**



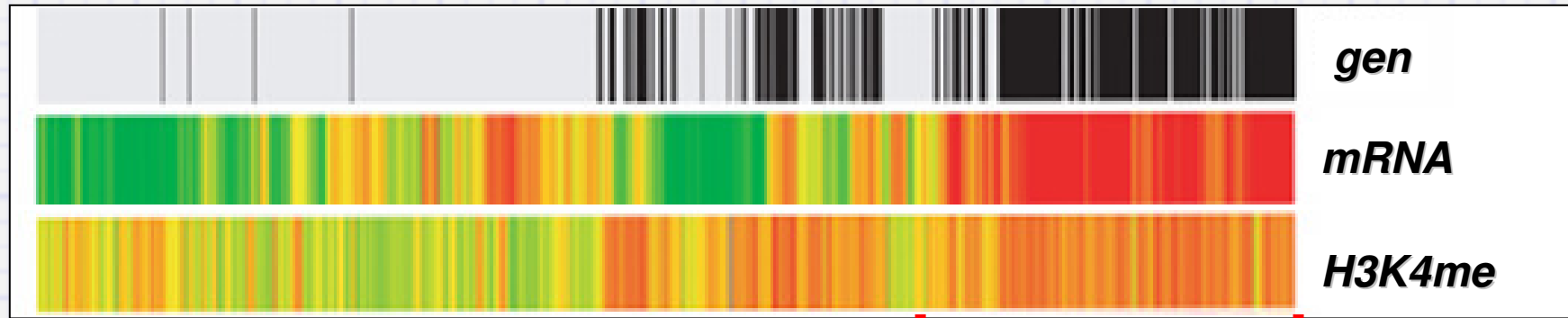
**Figure 1. Recruitment of Proteins to Histones**

(A) Domains used for the recognition of methylated lysines, acetylated lysines, or phosphorylated serines. (B) Proteins found that associate preferentially with modified versions of histone H3 and histone H4.

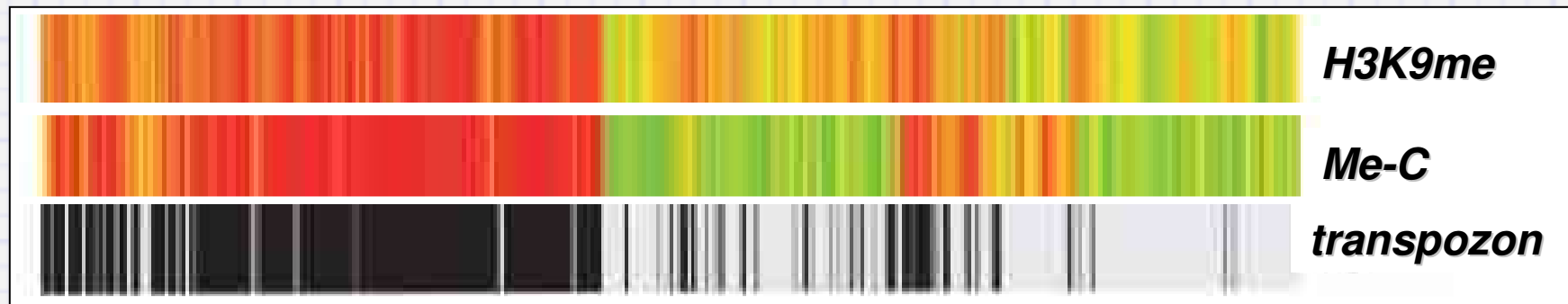
Kozaurides 2007

# Inne modyfikacje białek histonowych występują w sekwencjach genów kodujących białka, inne w sekwencjach transpozonowych

*Analiza typu ChIP-chip*

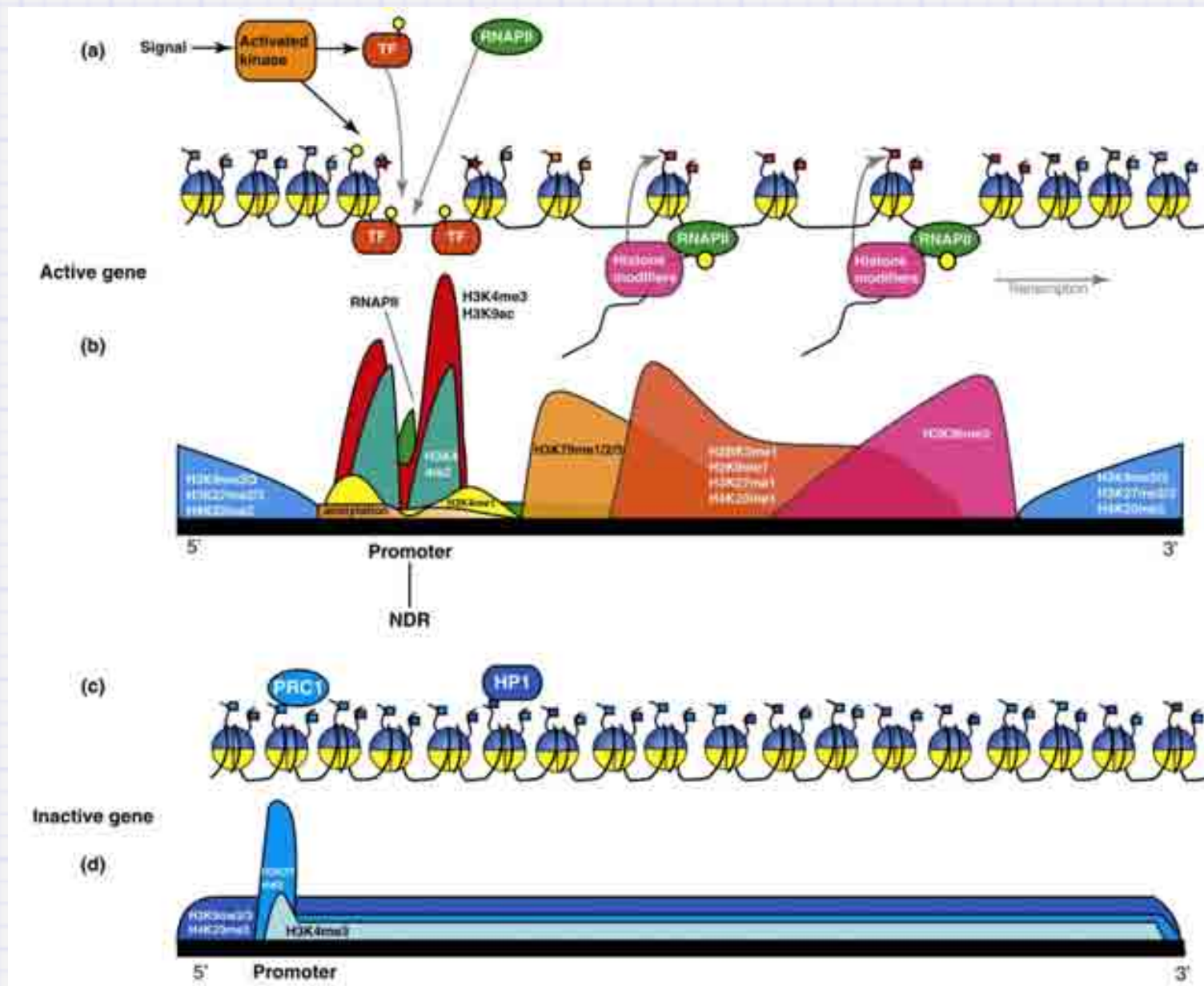


*metylacja H3K4 występuje w genach aktywnie transkrybowanych*



*metylacja H3K9 jest związana z metylowanym DNA (Me-C) i transpozonami*

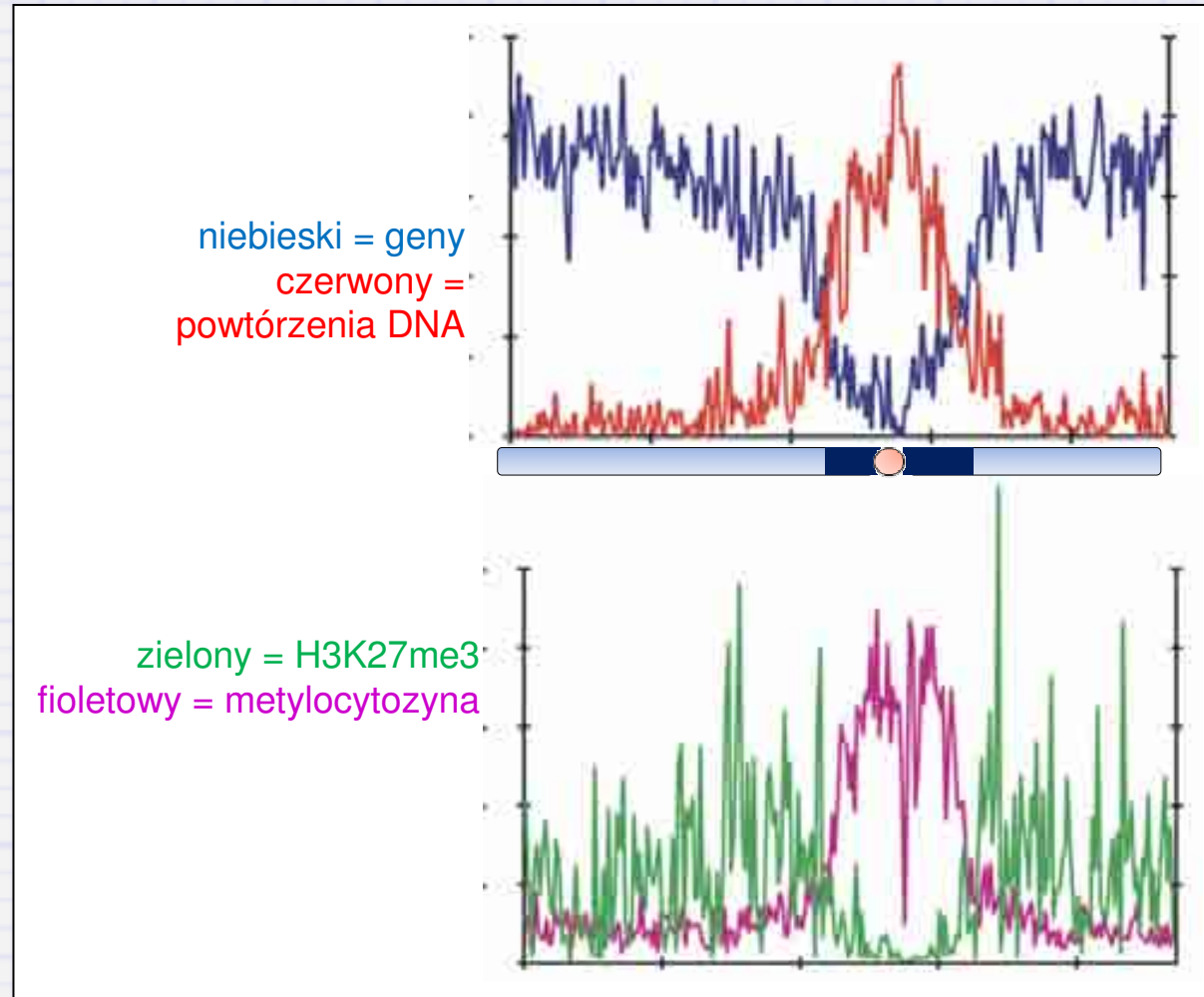
***czerwony = silna korelacja***  
***zielony = słaba korelacja***





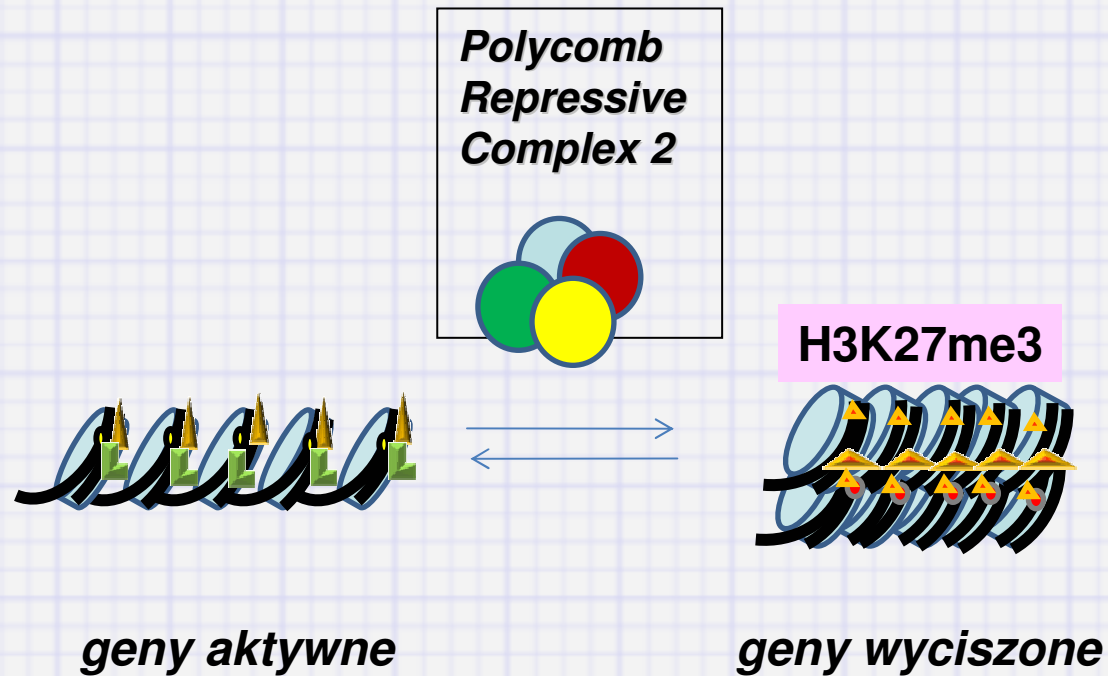
# H3K27me3: w genach kodujących białka

Analiza typu ChIP-chip



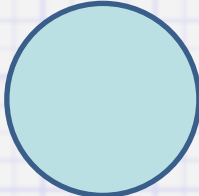
H3K27me3  
u *A. thaliana*  
występuje  
w rejonach  
bogatych  
w sekwencje  
kodujące

# Metylacja H3K27me3: kompleks PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*)



# Białka rdzenia kompleksu PRC2 u *Drosophila*

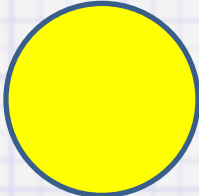
PRC2  
u *D. melanogaster*:  
4 zakonserwowane  
ewolucyjnie białka



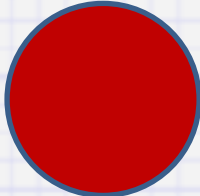
E(Z)



ESC



SU(Z)12



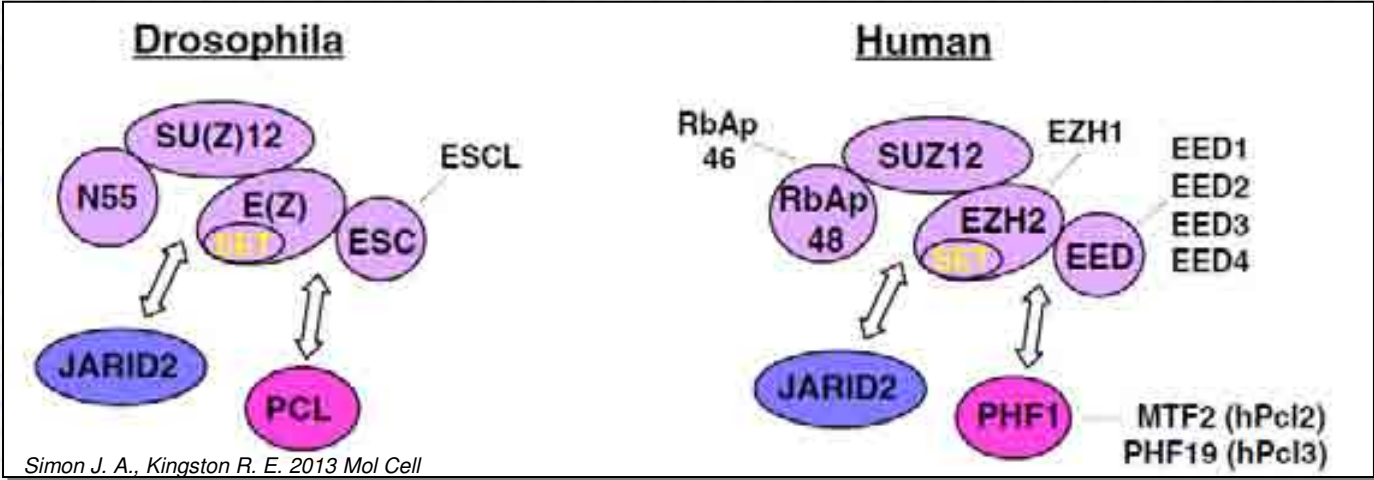
NURF55

*Enhancer of zeste (E(Z))*

*Extra sex comb (ESC)*

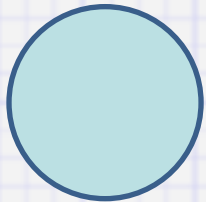
*Suppressor of zeste 12 (SU(Z)12)*

*NURF55*

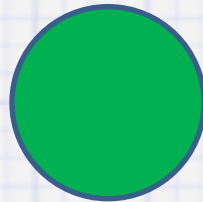


# Białka rdzenia kompleksu PRC2 u *Arabidopsis*

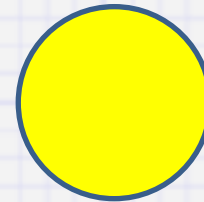
## *Drosophila* PRC2



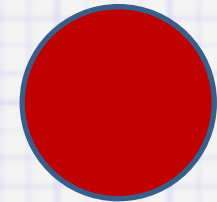
**E(Z)**  
(methylase)



**ESC**



**SU(Z)12**



**NURF55**

## *Arabidopsis* PRC2

**CURLY LEAF (CLF)**

**MEDEA (MEA)**

**SWINGER (SWN)**

**FERTILIZATION  
INDEPENDENT  
ENDOSPERM  
(FIE)**

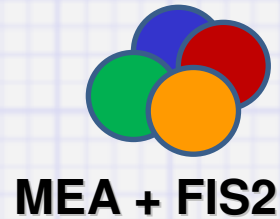
**FERTILIZATION-  
INDEPENDENT SEED 2  
(FIS2)**

**EMBRYONIC FLOWER 2  
(EMF2)**

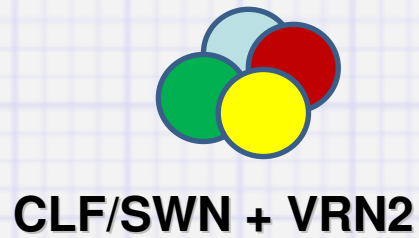
**VERNALIZATION 2 (VRN2)**

**MULTICOPY  
SUPPRESSOR  
OF IRA1  
(MSI1,2,3,4,5)**

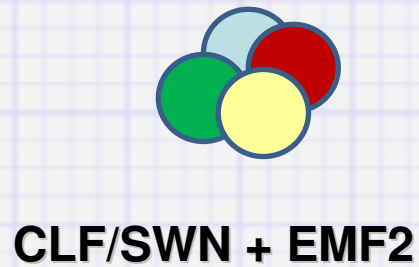
# U roślin: różne kompleksy PRC2 odgrywają różne role



*kiełkowanie*

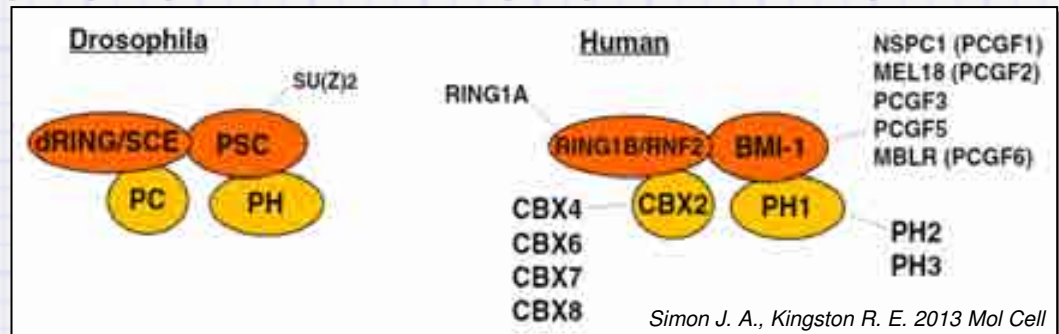
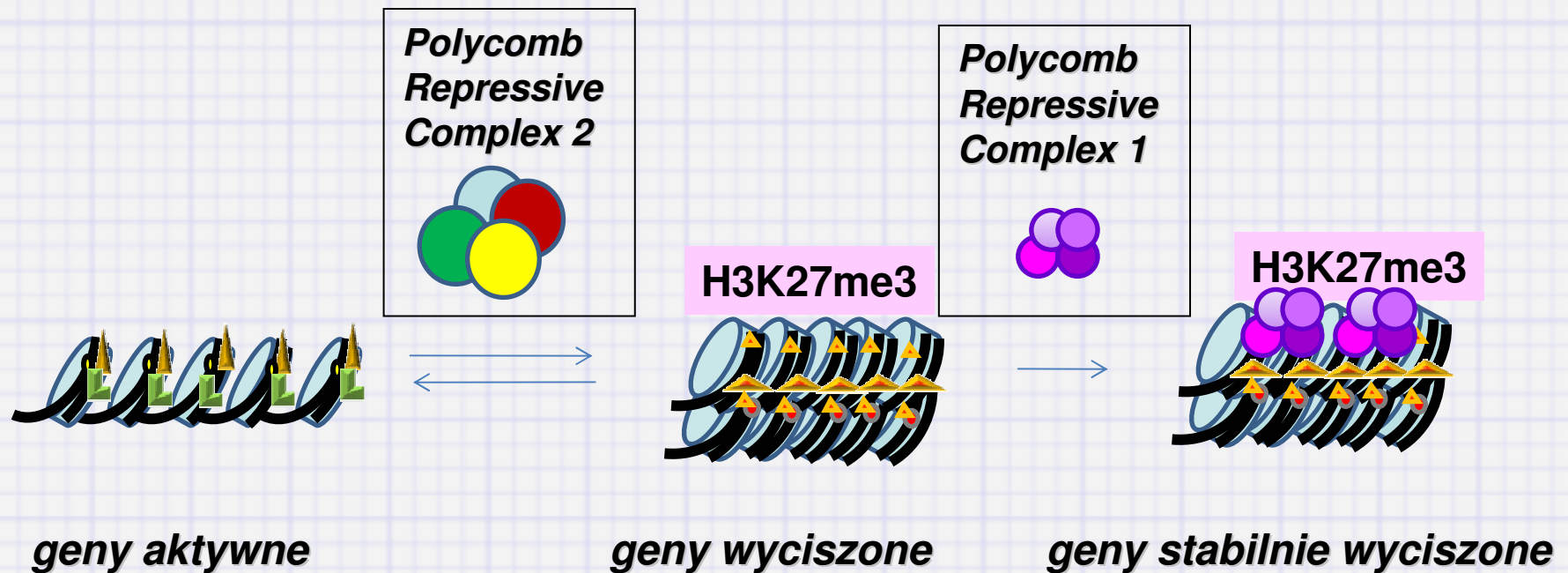


*indukcja kwitnienia*



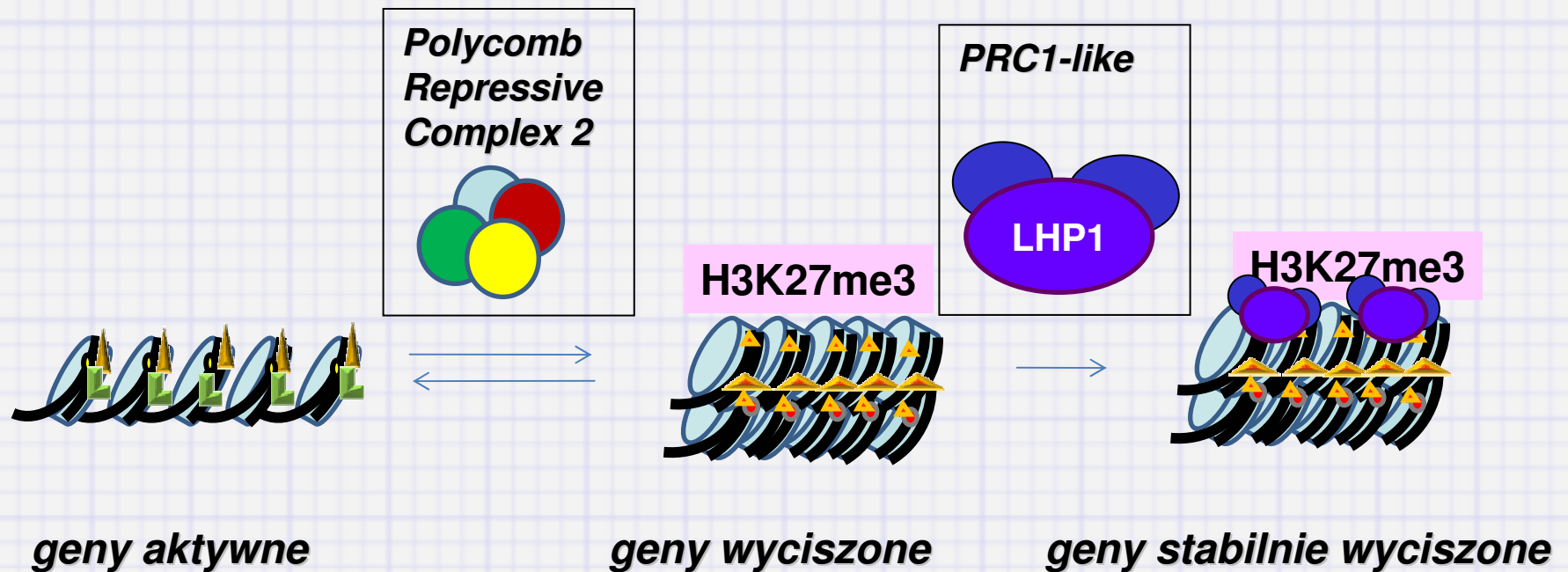
*rozwój kwiatów*

# Metylacja H3K27me3 u zwierząt jest utrzymywana przez PRC1





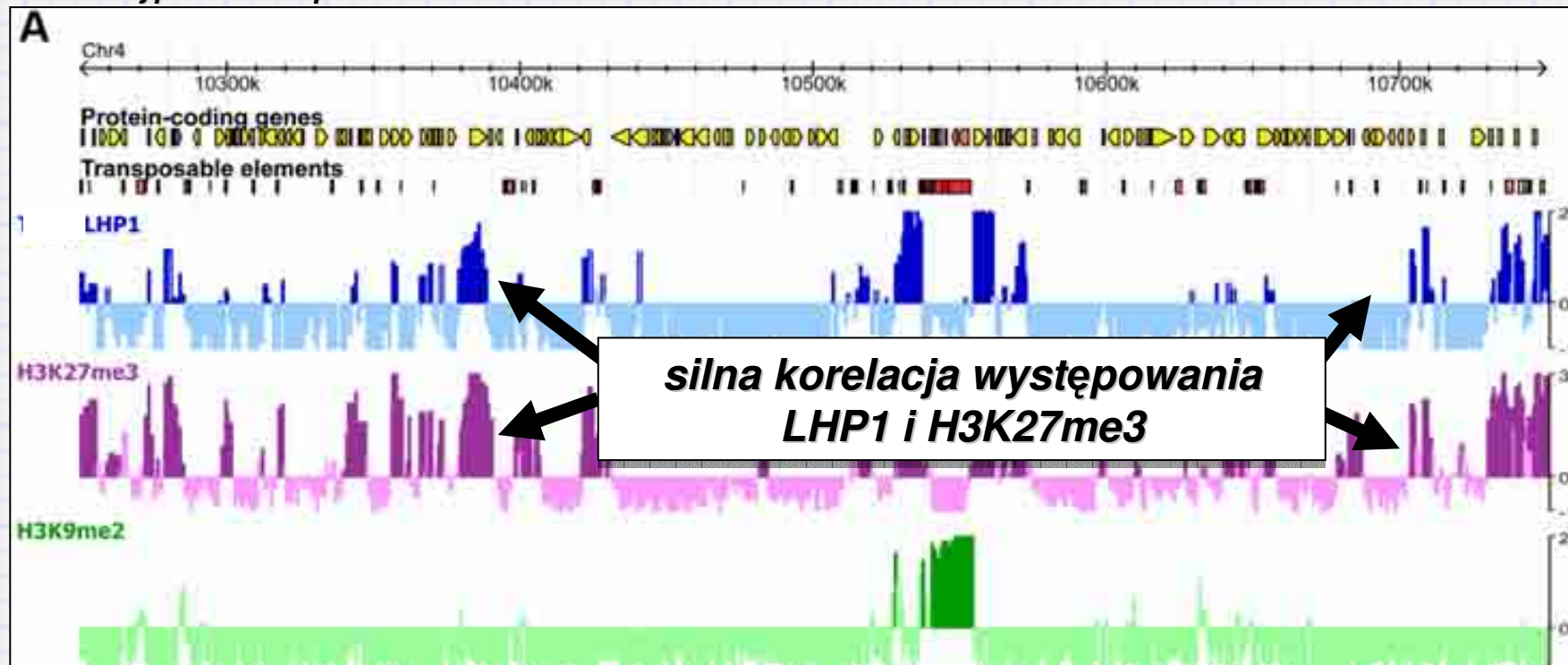
# PRC1-like u roślin działa podobnie



**LHP1 wiąże  
specyficznie  
H3K27me3**

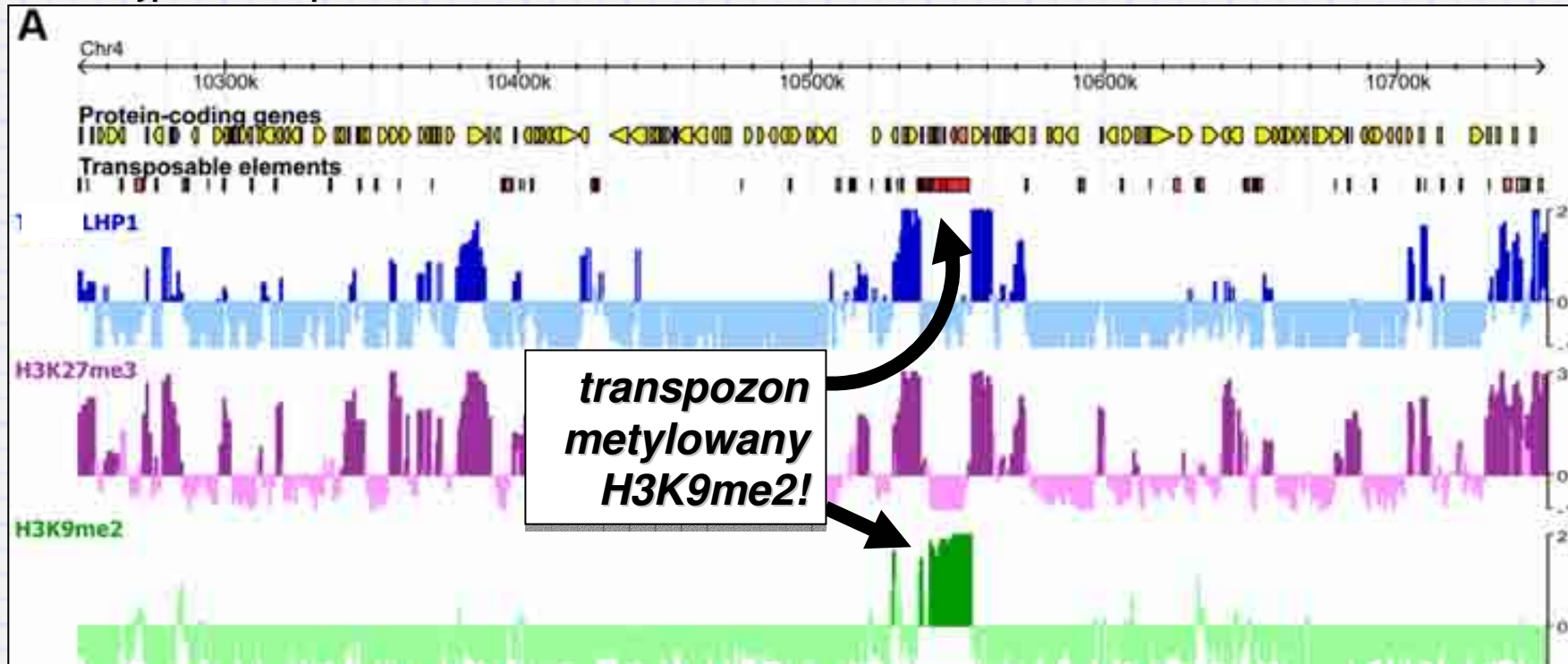
# LHP1 występuje razem z metylacją H3K27me3

Analiza typu *ChIP-chip*

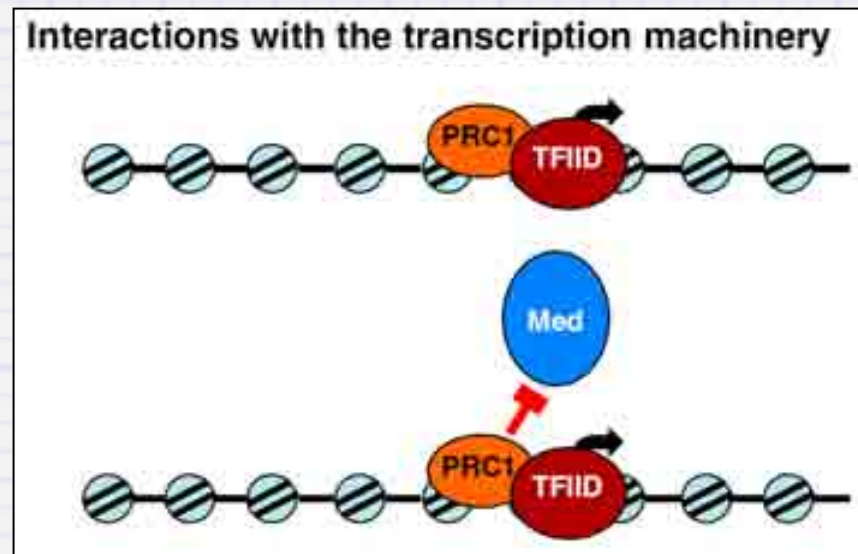
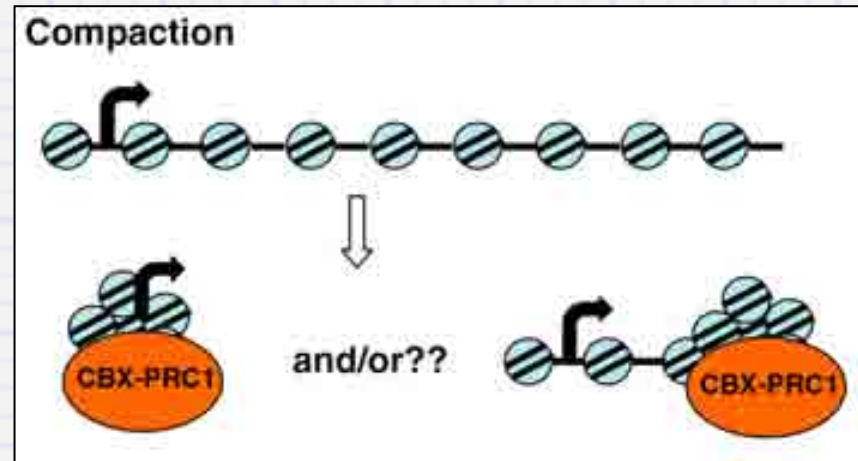
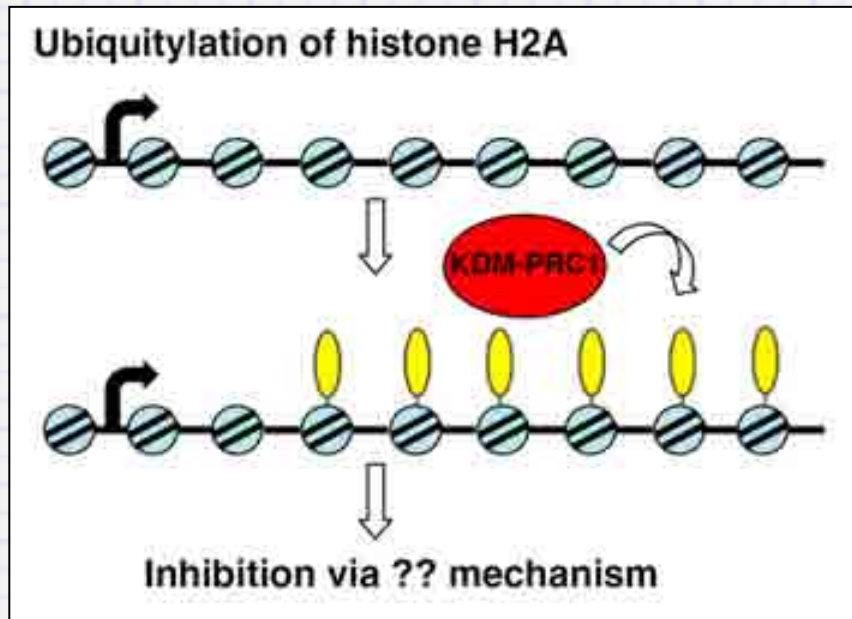


# LHP1 występuje razem z metylacją H3K27me3

Analiza typu *ChIP-chip*

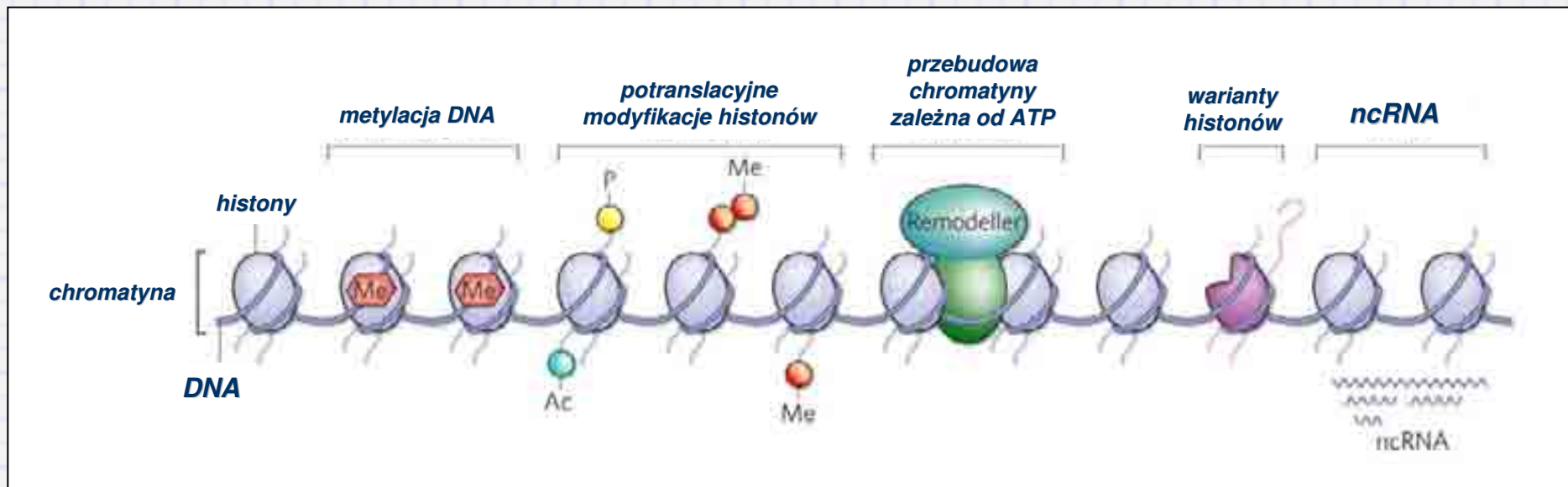


# Mechanisms of repression by PRC1 family complexes





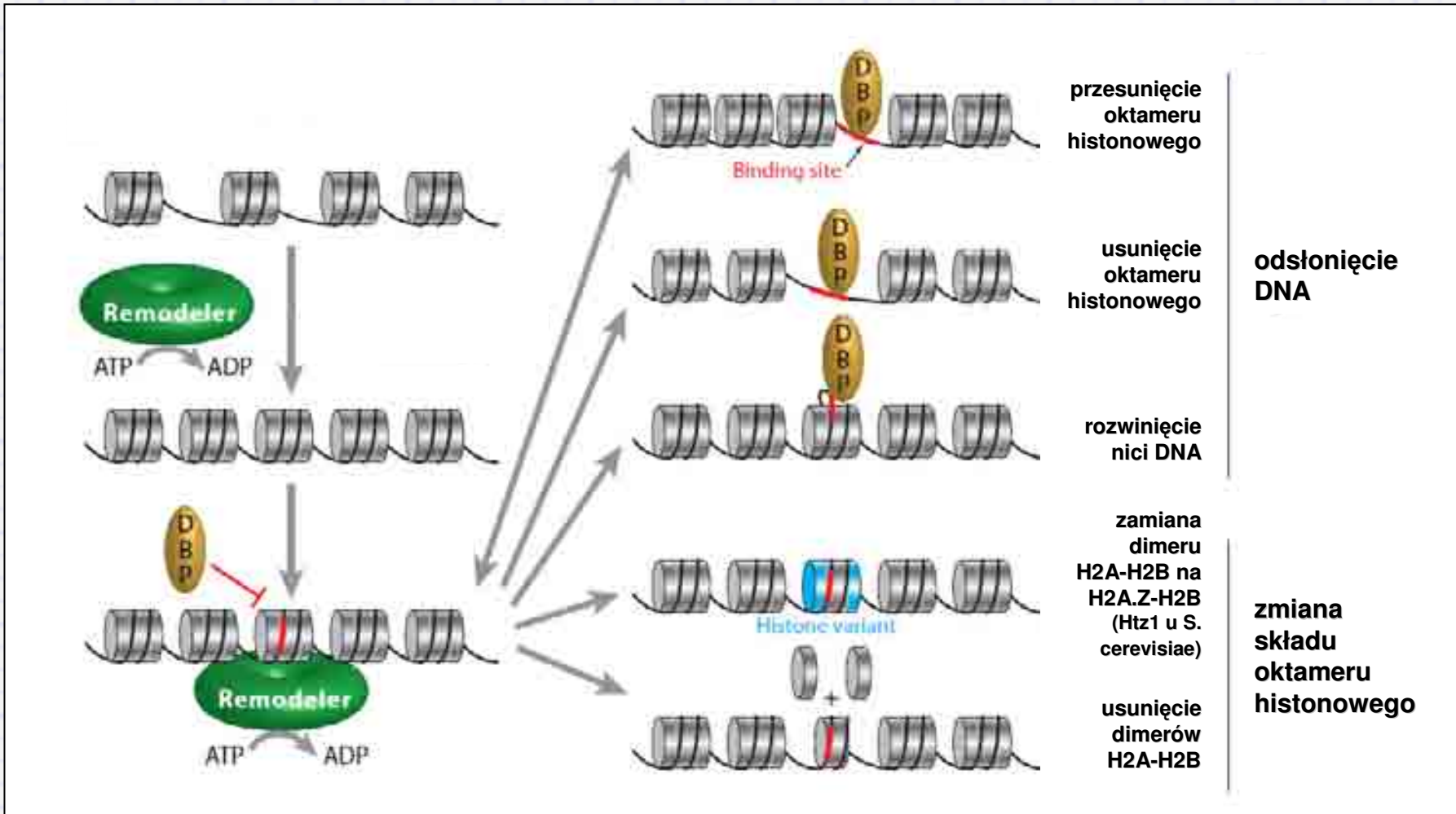
# Przebudowa chromatyny zależna od ATP (*chromatin remodelling*)



**Aktywność kompleksów przebudowujących chromatynę zależy od ATP, w wyniku ich działania zmienia się sposób oddziaływania histon-DNA. Kompleksy remodelujące zaangażowane są zarówno w aktywację, jak i represję transkrypcji.**

Dulac C. (2010) Nature

# Przebudowa chromatyny:





# Wyróżniamy cztery rodziny kompleksów odpowiedzialnych za przebudowę chromatyny:

SWI/SNF family



**SWI2:**  
zawierają bromodomenę,  
wszystkie rodzaje przebudowy  
chromatyny

ISWI family



**ISWI:**  
przesuwanie nukleosomów

CHD family



**CHD:**  
zawierają chromodomenę,  
regulacja transkrypcji

INO80 family

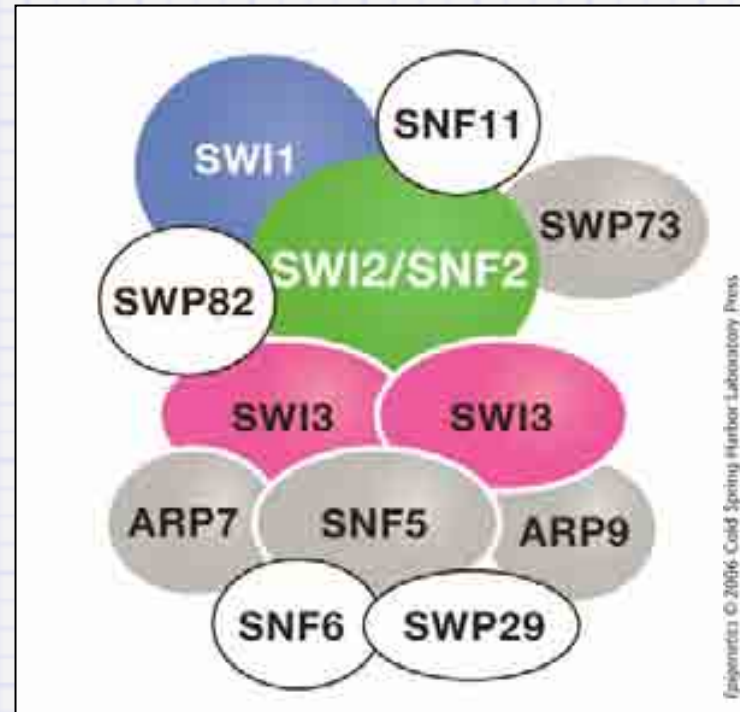


**INO80/SWR:**  
wymiana histonów

# Kompleksy przebudowujące chromatinę składają się z wielu białkowych podjednostek

**Drożdżowy SWI/SNF:**

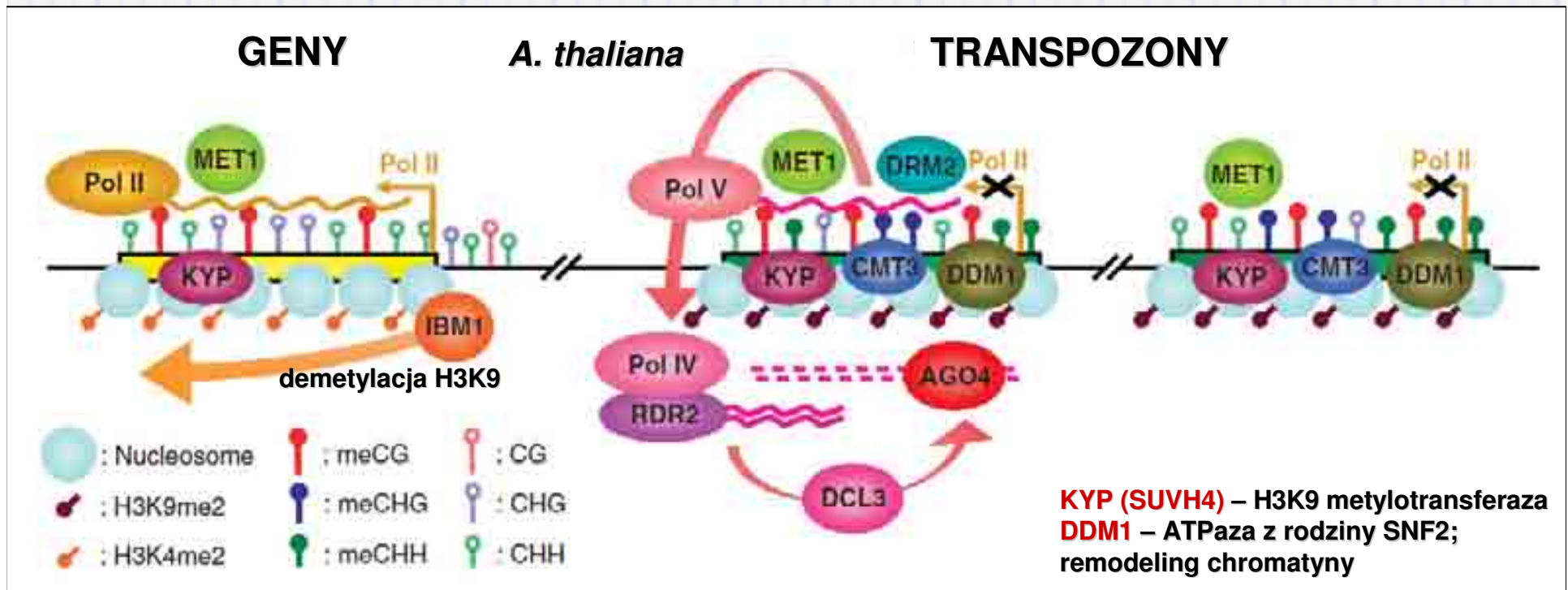
**11 białek**



potrzebny do ekspresji genów decydujących o typie koniugacyjnym drożdży (*switching*), oraz ekspresji genów regulujących metabolizm sacharozy (*sucrose non-fermenting*)

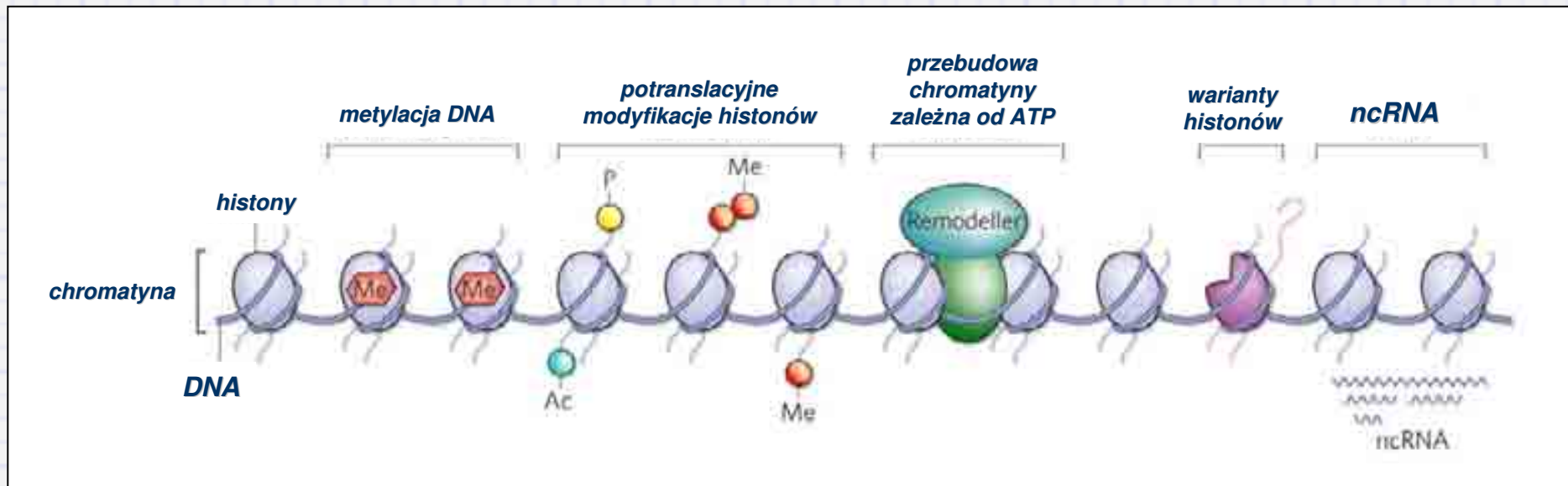
# DDM1 (*decrease in DNA methylation1*) : ATPaza z rodziny SWI/SNF u *A. thaliana*

**DDM1** jest specyficznie zaangażowana w metylację transpozonów



**DDM1** jest kluczowym czynnikiem łączącym przebudowę chromatyny i wprowadzanie/utrzymywanie metylacji DNA

# Warianty histonów



Dulac C. (2010) Nature

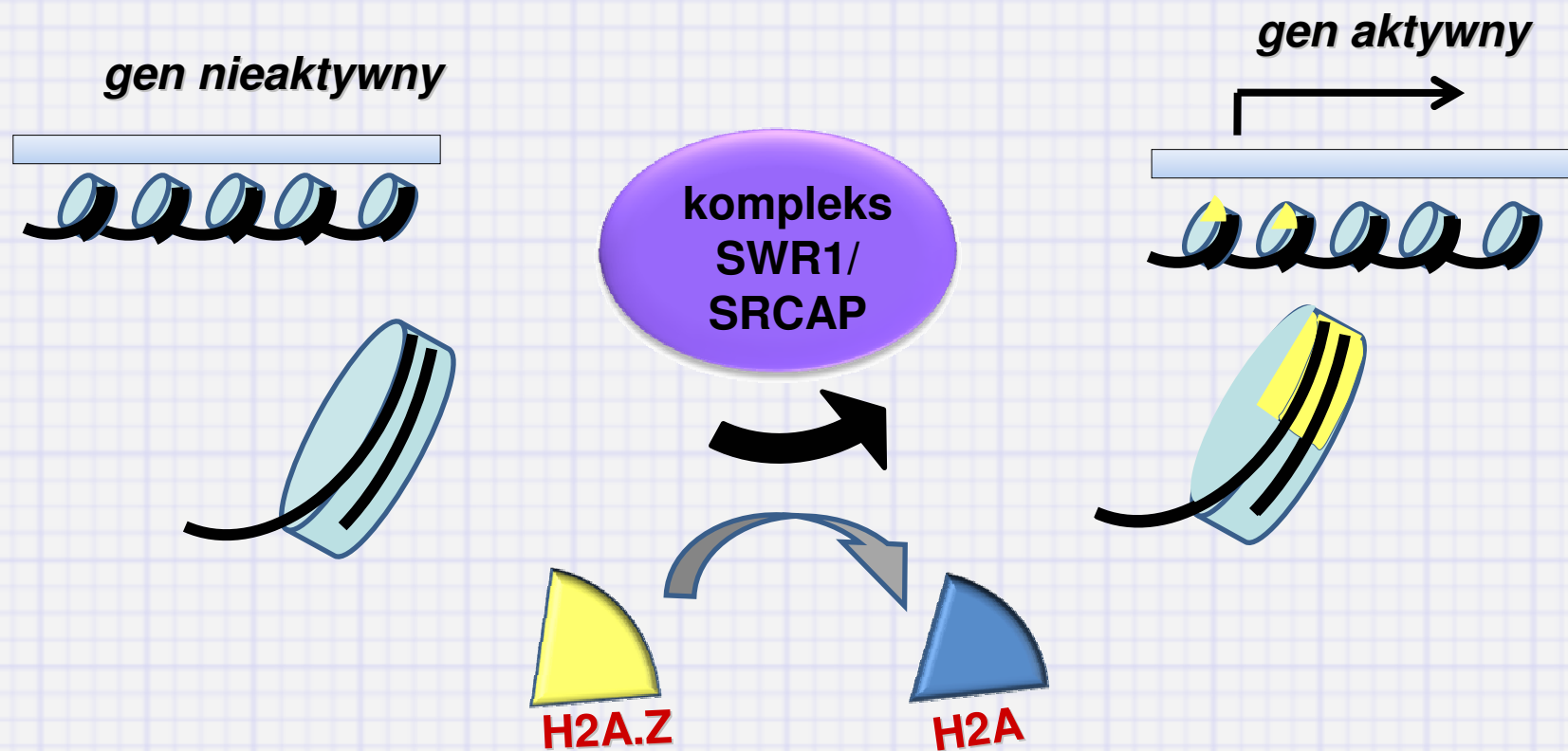
Za wymianę różnych wariantów histonów w oktamerze histonowym odpowiadają kompleksy przebudowujące chromatynę z rodziny **INO80/SWR**



## Warianty histonów:

Family	Variant	Function	Distribution
H4	Canonical	Genome packaging	Universal
H3	Canonical (H3.2**)	Genome packaging	Widespread
H3	H3.3	Replacement	Universal
H2A	Canonical	Genome packaging	Widespread
H2B	Canonical	Genome packaging	Universal
H2A	H2A.X	DNA ds break repair	Universal
H2A	H2A.Z	Promoter insulation	Universal
H3	CenH3 (CENP-A, others)	Centromere identity	Universal
H2A	macroH2A	X-inactivation	Animals
H3	H3t	Testes-specific	Mammals
H2B	TH2B	Testes-specific	Mammals
H2A	H2A.Bbd	Unknown	Mammals
H2B	H2BFWT	Testes-specific	Mammals
H2A	H2AL1,L2	Testes-specific	Mammals
H2A	H2Abd	DNA ds break repair	Bdelloids
H3	H3V	Transcription termination	Trypanosomes
H4	H4V	Transcription termination	Trypanosomes
H2B	H2BV	Transcription initiation	Trypanosomes

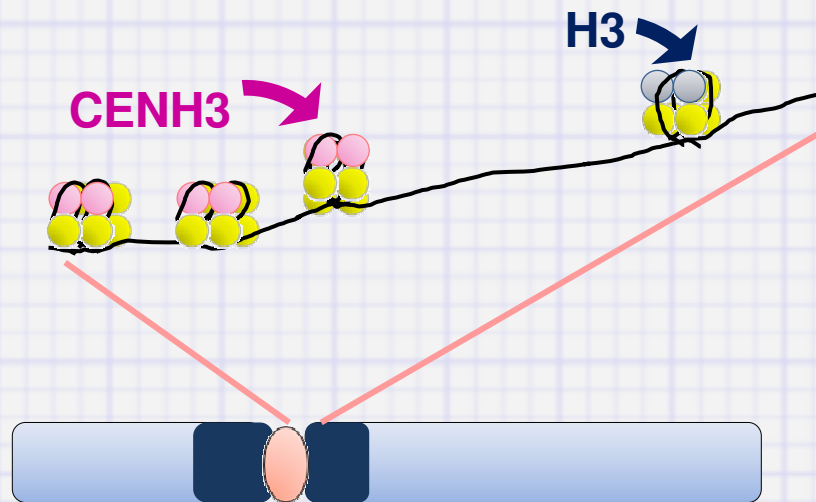
# Histon **H2A.Z**: aktywacja transkrypcji



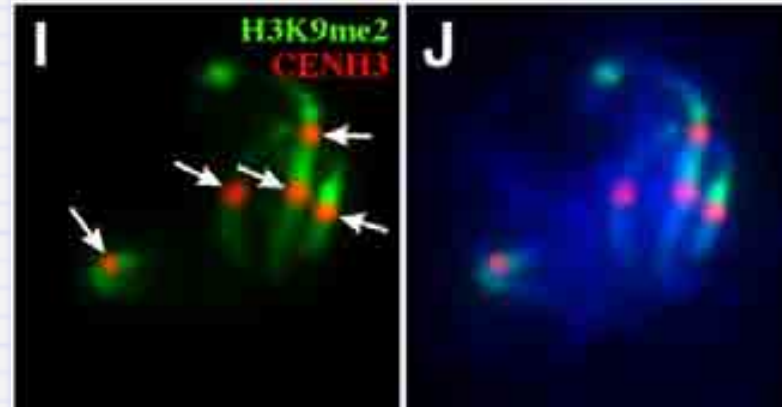
**Obecność odmiany histonu H2 - H2A.Z sprzyja transkrypcji.  
Kompleks SWR1/SRCAP zamienia histon **H2A** na **H2A.Z****



# Histon **CENH3**: centromery

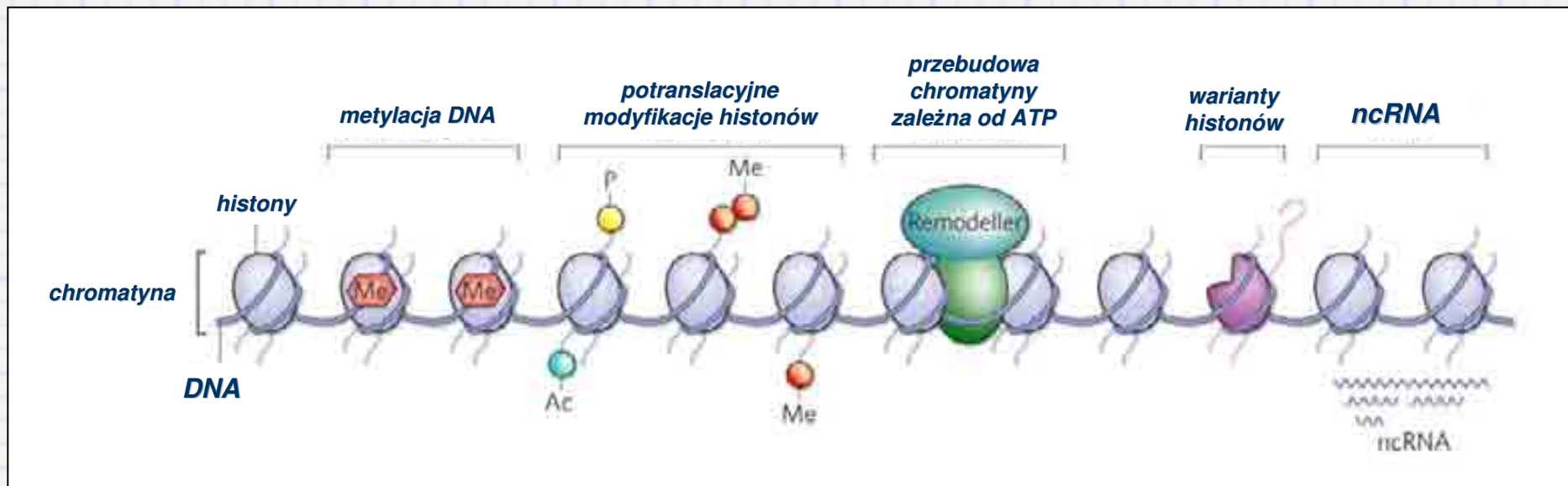


nukleosomy w centromerach zawierają wariant histonu H3: **CENH3** (CENP-A u zwierząt)



centromery zawierające **CENH3** są otoczone obszarem bogatym w metylację **H3K9me2** (*heterochromatyna przycentromerowa*)

# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA



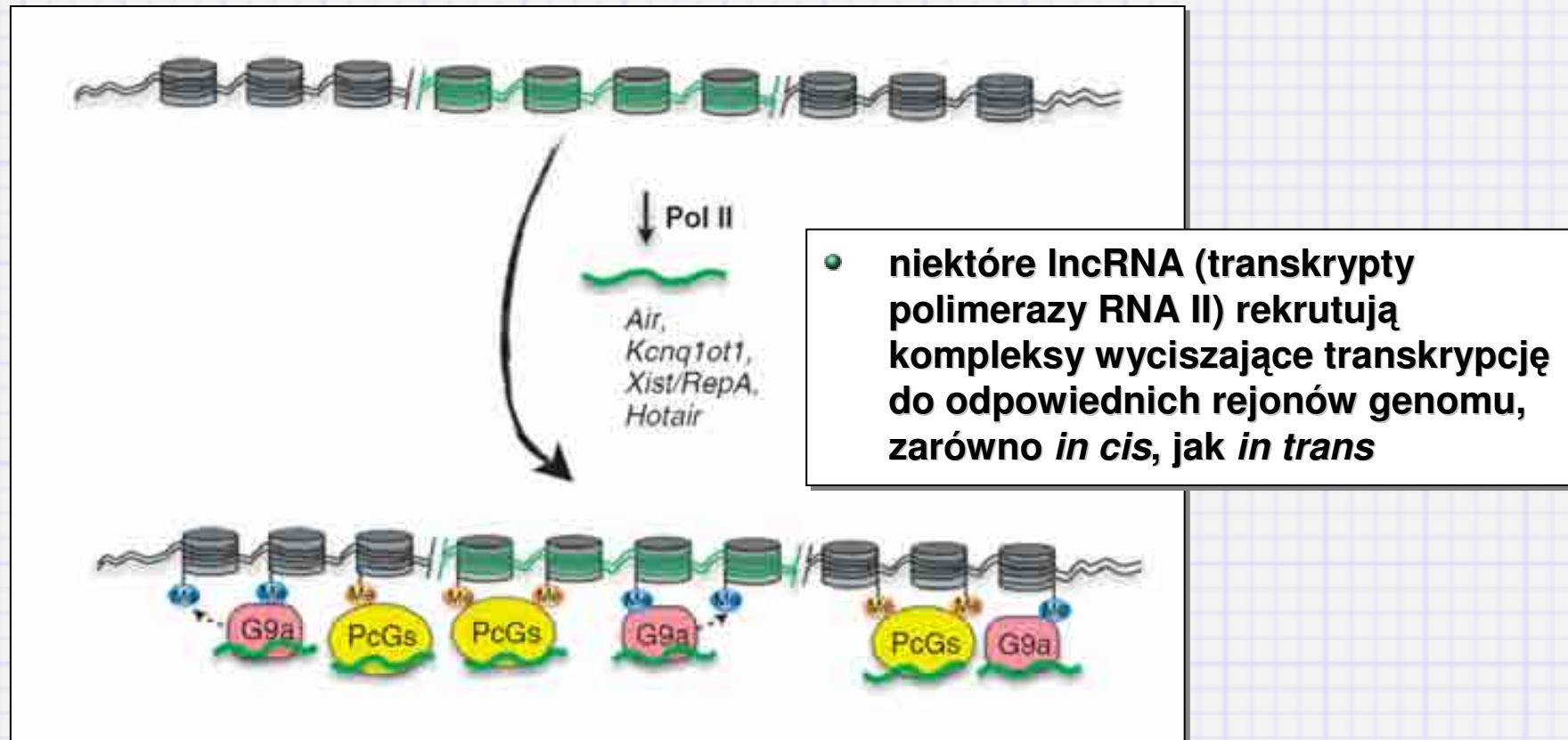
**RNA jest jedynym jak dotąd poznany czynnikiem inicjującym dziedziczenie epigenetyczne i odróżniającym sekwencje, które mają zostać wyciszone lub aktywowane**

Dulac C. (2010) Nature

# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

- epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez **lncRNA** (*long non-coding RNA*) u ssaków: inaktywacja chromosomu X
- kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*) u *Drosophila melanogaster* → **roX**
- **RdDM** (RNA-directed DNA methylation) u roślin i *S. pombe* metylacja DNA zależna od RNA → **20-24nt siRNA**

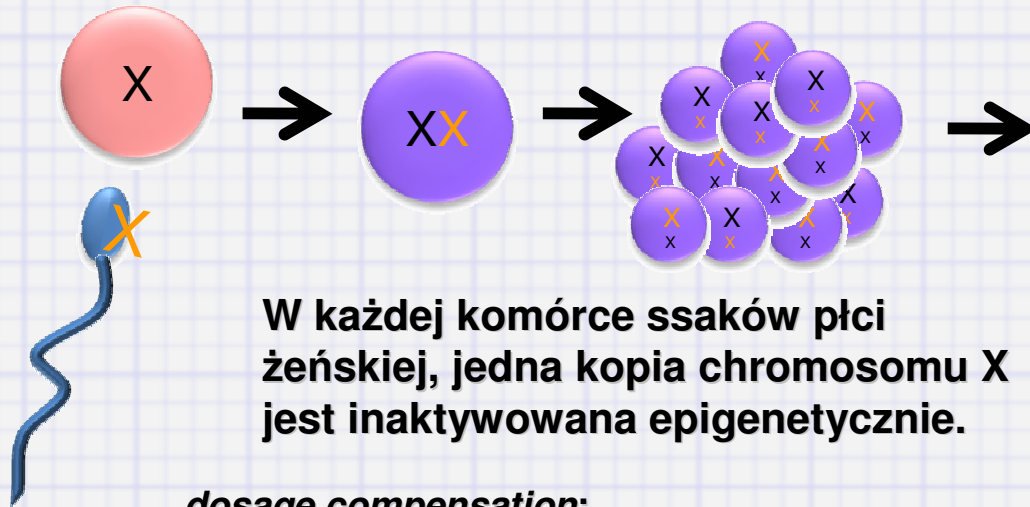
# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez lncRNA u ssaków



- niektóre lncRNA (transkrypty polimerazy RNA II) rekrutują kompleksy wyciszające transkrypcję do odpowiednich rejonów genomu, zarówno *in cis*, jak *in trans*

- PcG- Polycomb group proteins
- G9a- metylotransferazy histonowe /H3K9/H3K27
- **XIST** → inaktywacja chromosomu X u ssaków (dosage compensation: wyrównanie poziomu ekspresji genów chromosomów X)

# Inaktywacja chromosomu X: wyciszanie epigenetyczne



**dosage compensation:**  
wyrównanie poziomu ekspresji genów chromosomów X

Kolor futra u kotów jest częściowo determinowany przez gen *orange*, zlokalizowany na chromosomie X. Heterozygotyczna kotka posiada mozaikowe zabarwienie futra:

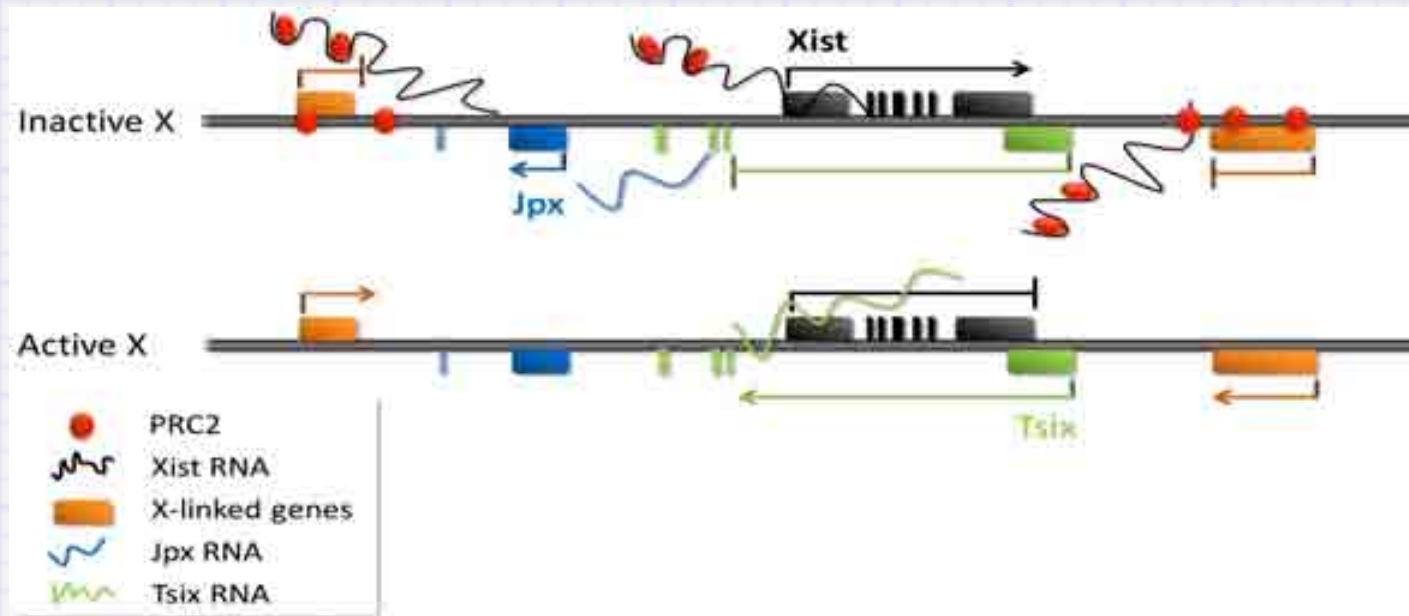
- zależnie od chromosomu X podlegającego inaktywacji, w melanocytach dochodzi do ekspresji określonej formy melaniny:*
- *eumelanina – czarno-brązowa*
  - *feomelanina – żółto-czerwona*



Photo credit: [DrL](#)



# Inaktywacja chromosomu X: wyciszanie epigenetyczne



- ***Mus musculus*:** u samic od wczesnego etapu rozwoju zarodkowego na aktywnym chromosomie X ekspresja Tsix, na nieaktywnym ekspresja Xist
- 17kb (u myszy; ludzki 19kb) ncRNA XIST opłascza chromosom X



# Inaktywacja chromosomu X: wyciszanie epigenetyczne

- **XIST ncRNA** uruchamia zmiany epigenetyczne, które zapewniają „pamięć komórkową” stanu nieaktywnego:

zamiana histonu **H2A** na **makroH2A**  
metylacja histonu H3:

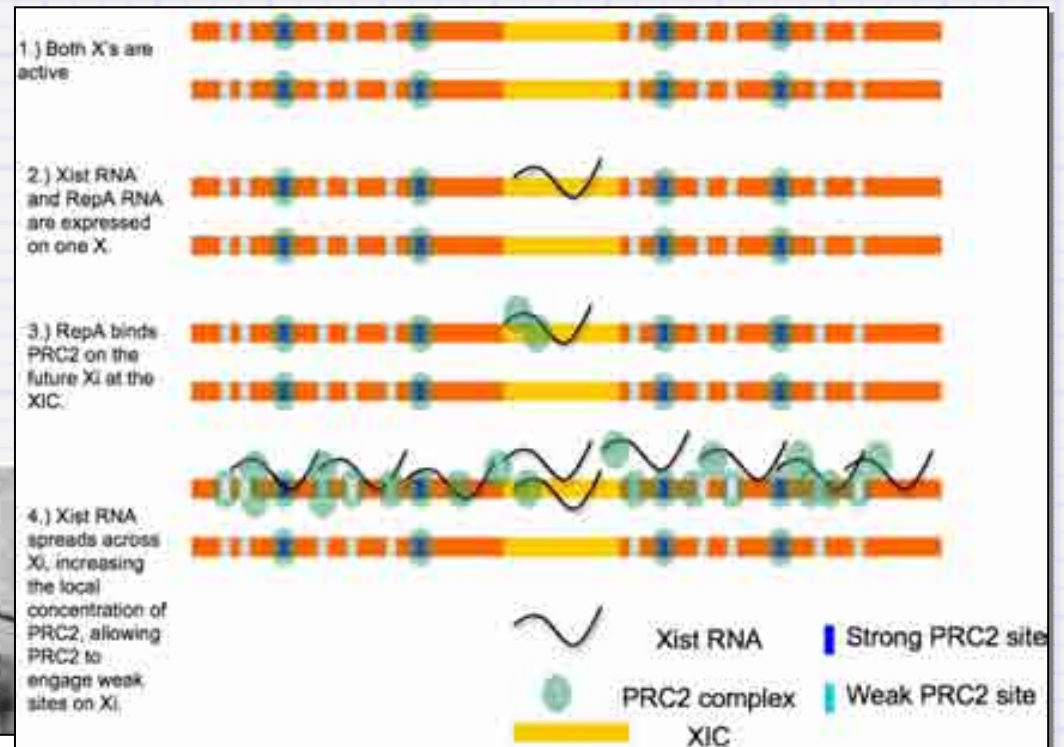
**H3K9**  
**H3K27**

deacetylacja histonu H4 (?)  
metylacja DNA /już po inaktywacji chromosomu

- tzw. **ciałko Barra**: skondensowana forma chromosomu X, głównie w postaci heterochromatyny



**RepA**: 1,6kb ncRNA zawierający sekwencje rejonu 5' transkryptu XIST bezpośrednio wiąże kompleks PRC2



# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

- epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez lncRNA (*long non-coding RNA*) u ssaków: inaktywacja chromosomu X
- kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*) u *Drosophila melanogaster* → **roX**
- **RdDM** (RNA-directed DNA methylation) u roślin i *S. pombe* metylacja DNA zależna od RNA → **20-24nt siRNA**

# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

- epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez lncRNA (*long non-coding RNA*) u ssaków: inaktywacja chromosomu X
- kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*) u *Drosophila melanogaster* → **roX**
- **roX** ncRNA inicjuje modyfikacje histonów → u samców *Drosophila*  
zwiększenie aktywności chromosomu X  
acetylacja histonów  
demetylacja H3K9

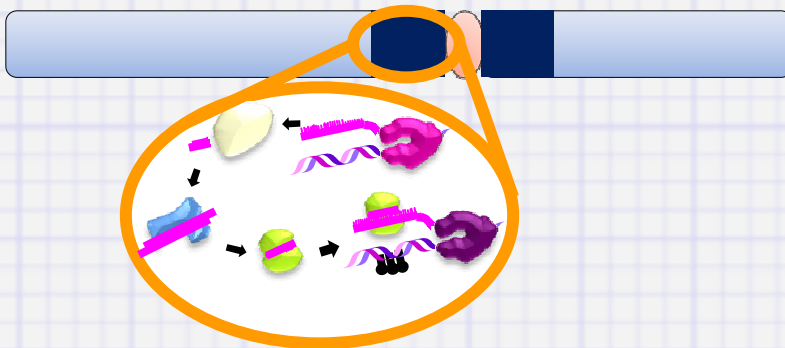
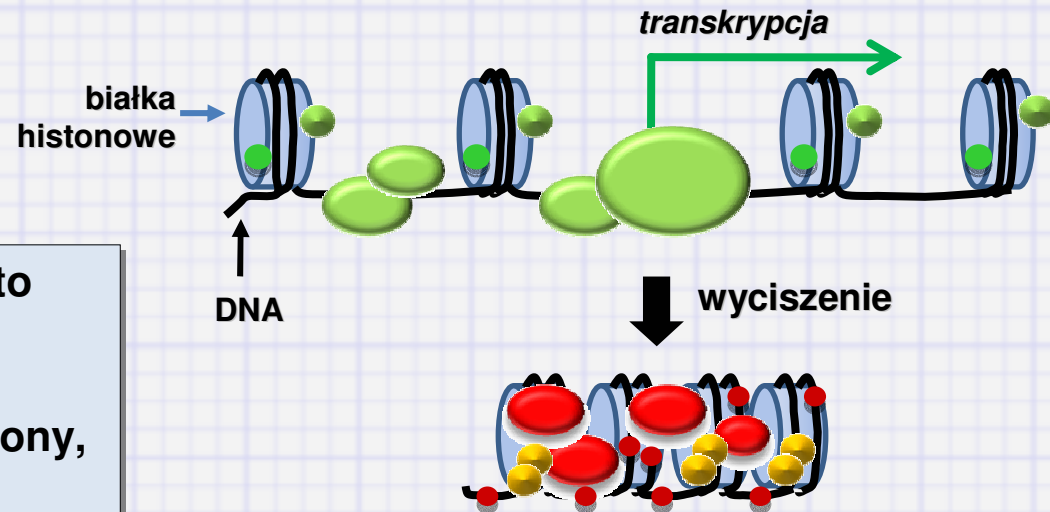
# Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

- epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez lncRNA (*long non-coding RNA*) u ssaków: inaktywacja chromosomu X
- kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*) u *Drosophila melanogaster* → **roX**
- **RdDM** (RNA-directed DNA methylation) u roślin i *S. pombe*  
metylacja DNA zależna od RNA → **20-24nt siRNA**

# Transkrypcyjne wyciszanie genów (TGS): hc-siRNA

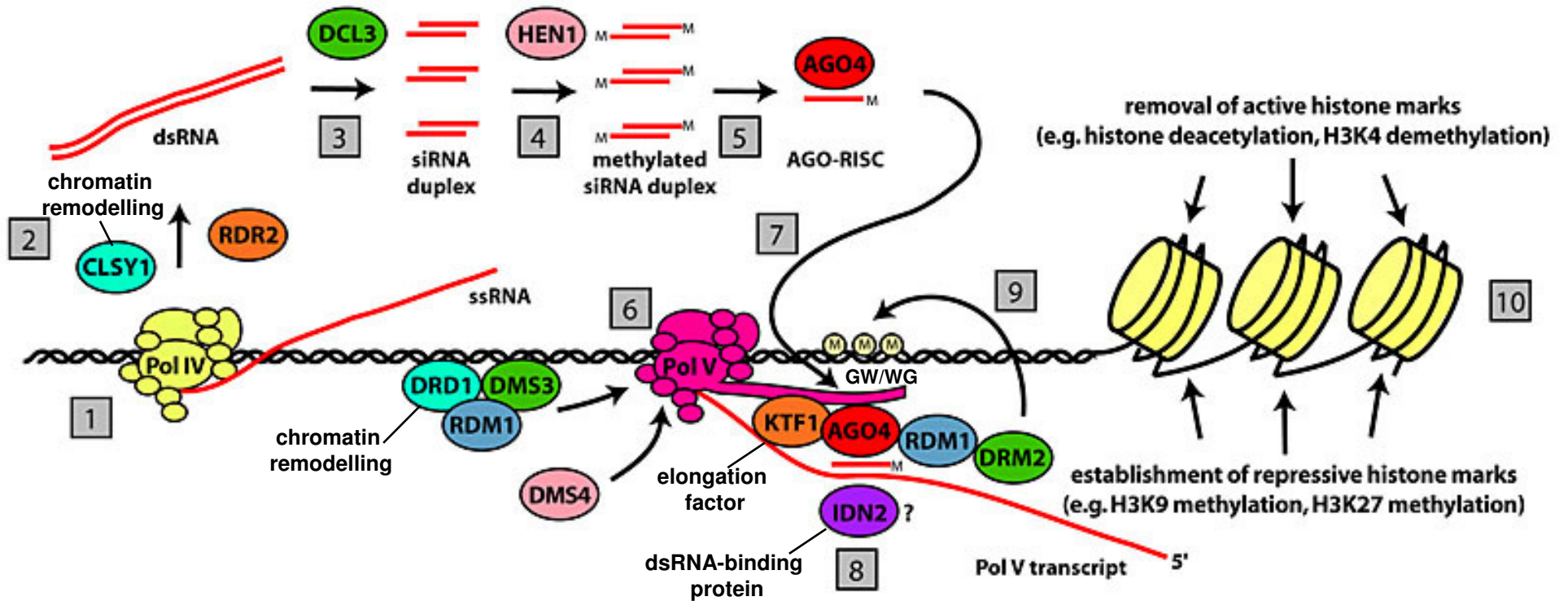
małe RNA mogą hamować transkrypcję określonych genów poprzez kowalencyjne modyfikacje DNA lub białek histonowych

Ten rodzaj wyciszenia jest często związany ze stale nieaktywnym transkrypcyjnie DNA, włączając rejony centromerowe i transpozony, ale również zachodzi w genach.



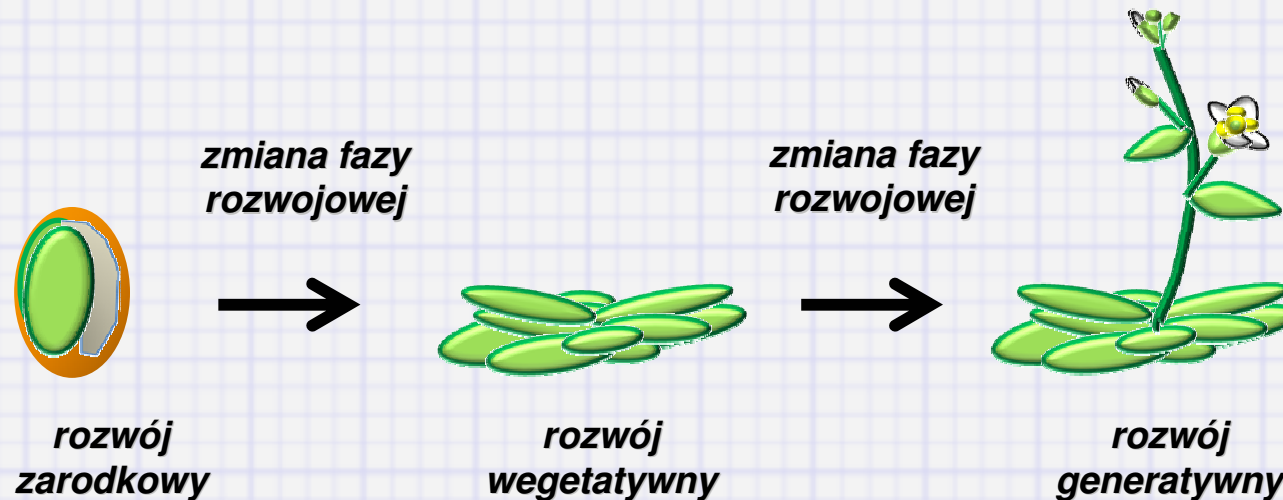


# Model mechanismu metylacji DNA zależnej od RNA (RdDM- RNA-directed DNA methylation)





# Epigenetyczne programowanie pomaga kontrolować zmiany faz rozwojowych u roślin



## Ekspresja FLC jest regulowana przez RdDM

- *regulacja ekspresji FLC: antysensowny RNA komplementarny do rejonu 3' genu FLC → transkrypcja antysens z 3'UTR prawdopodobnie przez polimerazę RNA IV*
- *regulacja ekspresji FLC: wymaga obecności DCL3, RDR2 i polimerazy RNA IV, transkrypcja przez polimerazę IV → substrat dla DCL3 do produkcji siRNA, które rekrutują kompleksy modyfikujące histony → wyciszenie ekspresji genu FLC*

